

**Endotheliales NO steigert die Sekretion der inflammatorischen
Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ aus Typ₂-Zellen der Lunge in einem Ko-
Kultur-Modell *in vitro***

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christian Oliver Vokuhl

aus Göttingen

Kiel 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik V
Leiter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter I: Prof. Dr. Dr. Grimminger
Gutachter II: Prof. Dr. Lindemann

Tag der Disputation: 14.03.2006

Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Christian Oliver Vokuhl

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
Cox-1	Cyclooxygenase-1
Cox-2	Cyclooxygenase-2
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und andere
HLMEC	human lung microvascular endothelial cells
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
N ₂	Stickstoff
NO	Stickstoffmonoxid
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
rpm	rounds per minute
Typ ₁ -Zelle	Alveolarepithel-Typ ₁ -Zelle
Typ ₂ -Zelle	Alveolarepithel-Typ ₂ -Zelle
VEGF	vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort.....	1
2. Einleitung.....	1
2.1 ARDS in der Intensivmedizin.....	1
2.1.1 Epidemiologie des ARDS.....	1
2.1.2 Definition des ARDS.....	2
2.1.3 Ursachen für die Entwicklung eines ARDS.....	2
2.1.4 Pathogenese des ARDS.....	3
2.2 Morphologie und Aufbau der Alveole.....	6
2.2.1 Das Alveolarsystem.....	6
2.2.2 Alveolarepithelzellen Typ ₂	6
2.2.3 Alveolarepithelzellen Typ ₂	7
2.3 Die Funktion der Alveolarepithelzelle Typ₂.....	8
2.3.1 Biosynthese und Funktion des Surfactants.....	8
2.3.2 Reduktion der alveolären Flüssigkeitsmenge.....	10
2.3.3 Alveolarepithelzellen während der Inflammation.....	10
2.4 Physiologische Funktionen der Endothelzelle.....	12
2.5 Synthese und Funktion der Arachidonsäurederivate PGE₂ und PGI₂.....	14
2.5.1 Synthese der Arachidonsäurederivate.....	14
2.5.2 Funktion der Cyclooxygenasen.....	14
2.5.3 Die PG-Synthasen.....	16
2.5.4 Wirkungen von PGE ₂	17
2.5.5 Wirkungen von PGI ₂	21
2.6 Synthese und Funktion von VEGF.....	22
2.7 Synthese und Funktion von Stickstoffmonoxid (NO).....	23
2.8 Der elektrische Widerstand als Differenzierungsmarker im epithelialen Zellverband der Alveolarepithelzelle.....	25
2.9 Fragestellung.....	26

3. Material und Methoden.....	28
3.1 Untersuchungsmaterial.....	28
3.1.1 Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial.....	28
3.1.2 Enzyme und Sera.....	29
3.1.3 Pharmaka und Agenzien.....	30
3.1.4 Kommerzielle Assay Systeme.....	31
3.1.5 Instrumente und Geräte.....	31
3.1.6 Versuchstiere und Tierhaltung.....	32
3.1.7 Material von humanen Lungen.....	32
3.2 Zellbiologische Methoden.....	33
3.2.1 Isolation und Kultur von Alveolarepithel Typ ₂ -Zellen aus Rattenlungen (rTyp ₂ -Zellen) nach Dobbs, Gonzales und Williams.....	33
3.2.2 Isolation und Kultur von Alveolarepithel Typ ₂ -Zellen aus humanen Lungen (hTyp ₂ -Zellen).....	35
3.2.3 Identifizierung isolierter Alveolarepithelzellen Typ ₂ -Zellen.....	36
3.2.4 Vitalitätstests.....	37
3.2.5 Isolation und Kultur von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HLMEC).....	37
3.2.6 Identifizierung der Endothelzellen.....	38
3.2.7 Ko-Kultivation von Typ ₂ -Zellen und HLMEC.....	38
3.2.8 Kontrolle des Ko-Kultur-Systems.....	40
3.2.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz der Ko-Kultur.....	41
3.3 Proteinbiochemie.....	44
3.3.1 ELISA zur Detektion von PGE ₂	44
3.3.1.1 Lösungen, Antikörper und Materialien.....	44
3.3.2 ELISA zur Detektion von 6-Keto Prostaglandin F _{1α}	45
3.3.2.1 Lösungen, Antikörper und Materialien.....	45
3.3.3 ELISA zur Detektion von VEGF.....	45
3.4 Widerstandsmessung der Zelllayer.....	46
3.5 Statistische Auswertung.....	46
4. Ergebnisse.....	47
4.1 Übersicht.....	47

4.2 Freisetzung von PGE₂ in mono-kultivierten Typ₂-Zellen der Ratte sowie des Menschen im Vergleich zur Ko-Kultur von Typ₂-Zellen mit HLMEC.....	47
4.2.1 Induktion des Prostaglandins PGE ₂ während der Ko-Kultur von Typ ₂ -Zellen der Ratte mit HLMEC.....	48
4.2.2 Induktion des Prostaglandins PGE ₂ während der Ko-Kultur von humanen Typ ₂ -Zellen mit HLMEC.....	49
4.3 Freisetzung von PGI₂ in mono-kultivierten Typ₂-Zellen der Ratte sowie des Menschen im Vergleich zur Ko-Kultur von Typ₂-Zellen mit HLMEC.....	50
4.3.1 Induktion des Prostaglandins PGI ₂ während der Ko-Kultur von Typ ₂ -Zellen der Ratte mit HLMEC.....	51
4.3.2 Induktion des Prostaglandins PGI ₂ während der Ko-Kultur von humanen Typ ₂ -Zellen mit HLMEC.....	52
4.4 Freisetzung von VEGF in mono-kultivierten Typ₂-Zellen der Ratte sowie des Menschen im Vergleich zur Ko-Kultur von Typ₂-Zellen mit HLMEC.....	53
4.4.1 Inhibition der VEGF-Freisetzung während der Ko-Kultur von Typ ₂ -Zellen der Ratte mit HLMEC.....	53
4.4.2 Inhibition der VEGF-Freisetzung während der Ko-Kultur von humanen Typ ₂ -Zellen mit HLMEC.....	54
4.5 Überprüfung der Cyclooxygenase-Abhängigkeit der erhöhten PGE₂-, PGI₂- sowie der erniedrigten VEGF-Werte im Ko-Kultur-Modell.....	55
4.6 PGE₂-, PGI₂-Messung in mit N₂ aufgeschlossenen Typ₂-Zellen.....	60
4.7 Messung der PGE₂-, PGI₂- und VEGF-Werte im Ko-Kultur-System mit unmittelbarem Zellkontakt im Vergleich zu einem Ko-Kultur-System ohne Zellkontakt.....	60
4.8 Messung von erniedrigten PGE₂- und PGI₂-Werten nach Hemmung der endothelialen NO-Synthase in der Ko-Kultur.....	63
4.9 Messung von erhöhten PGE₂-und PGI₂-Werten nach Stimulierung von Typ₂-Zellen mit NO und L-Arginin.....	65
4.10 Messung von VEGF nach Hemmung der endothelialen NO-Synthase und nach Stimulation der Typ₂-Zellen mit NO bzw. L-Arginin.....	69
4.11 Inkubation von HLMEC mit VEGF.....	69
4.12 Widerstandsmessung: Indikator eines intakten Layers bei Kultivierung von Alveolarepithelzellen in der ko-bzw. mono-Kultur.....	70

5. Diskussion.....	72
5.1 Induktion der Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ in der Ko-Kultur aus Typ₂-Zellen und HLMEC.....	73
5.2 Die gesteigerte Prostaglandinsynthese im Ko-Kultur-Modell aus Typ₂-Zellen und HLMEC ist Cyclooxygenase-abhängig.....	75
5.3 Regulation der Prostaglandinsynthese durch NO.....	76
5.4 Mechanismen der erhöhten Prostaglandin-Synthese durch NO.....	80
5.5 Erniedrigte VEGF-Werte in der Ko-Kultur aus Typ₂-Zellen und HLMEC	81
5.6 Typ₂-Zellen entwickeln in der Ko-Kultur niedrigere elektrische Widerstände als mono-kultivierte Zellen.....	83
5.7 Therapeutische Relevanz der NO-Prostaglandin-Interaktionen.....	84
6. Zusammenfassung.....	86
7. Literaturverzeichnis.....	91
8. Danksagung.....	102
9. Lebenslauf.....	103

1. Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde in der Zeit von November 2000 bis November 2002 in dem Laborbereich der Klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ unter der Betreuung von Herrn Dr. Rose in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Grimminger am Zentrum für Innere Medizin durchgeführt. Für die notwendigen Experimente wurde zunächst ein Ko-Kultur-Modell, bestehend aus Typ₂-Zellen und humanen mikrovaskulären Endothelzellen, zur Untersuchung der alveolo-kapillären Membran in vitro im Labor neu etabliert. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss der Ko-Kultur aus Typ₂-Zellen und Endothelzellen auf die Parameter PGE₂, PGI₂, VEGF und den elektrischen Widerstand zu charakterisieren und anschließend mögliche Ursachen für eine veränderte Freisetzung bzw. im Falle des elektrischen Widerstandes ein verändertes Verhalten der Parameter herauszuarbeiten.

2.1. ARDS in der Intensivmedizin

2.1.1 Epidemiologie des ARDS

Das „Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS) ist ein auf Intensivstationen häufig auftretendes Krankheitsbild. Man geht davon aus, dass 5 – 10% aller Patienten auf Intensivstationen im Laufe ihres Aufenthaltes ein ARDS entwickeln (1).

Angaben zur Häufigkeit hängen allerdings in hohem Maße von der zugrundegelegten Definition ab, besonders vom Schweregrad der Gasaustauschstörung als Eingangskriterium eines ARDS.

Nach Angaben der Literatur wird allein eine Häufigkeit von 150000 Fällen pro Jahr in den USA geschätzt, was eine Inzidenz von 71 Patienten pro 100000 Einwohnern ergibt (2).

Andere Angaben schwanken zwischen einer Inzidenz von 3/100000 und 75/100000 (3, 4).

Auch die Zahlen zur Letalität des ARDS schwanken in Abhängigkeit vom Schweregrad und der zugrundeliegenden ursächlichen Erkrankung, einschließlich der Sepsis, zwischen 50 % und 70 % (4, 5).

2.1.2 Definition des ARDS

Das Krankheitsbild des ARDS wurde erstmals 1967 von Ashbaugh nach der Behandlung von 12 Patienten mit schwerem Lungenversagen beschrieben (6).

„Das ARDS charakterisiert eine akute Gasaustauschstörung der Lunge, verursacht durch verschiedene Auslöser, welche in der Regel von einer pulmonalen Flüssigkeitseinlagerung, Störung der pulmonalen Vasomotion und Abnahme der Compliance begleitet wird. Ein ARDS tritt bei Lungengesunden ohne besondere Prädisposition auf und ist unabhängig von Störungen des zentralen Atemantriebes, des Gasflusses in den großen und kleinen Atemwegen, des Blutflusses in den großen pulmonalen Gefäßen und der linksventrikulären Funktion“ (7).

Eine Definition für die klinische Diagnose eines ARDS wurde von der American-European Consensus Conference erstellt. Für die Diagnose sollten vorhanden sein: a) ein akuter Beginn, b) eine diffuse bilaterale Infiltration im Thoraxröntgenbild, c) ein pulmonal-arterieller Verschlussdruck von ≤ 18 mmHg oder kein Hinweis auf eine linksventrikuläre Hypertonie und d) eine verminderte Oxygenierung unabhängig von der PEEP-Beatmung, mit einer $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ Ratio von ≤ 200 mmHg (8).

2.1.3. Ursachen für die Entwicklung eines ARDS

Die Ursachen für die Entwicklung eines ARDS sind vielfältig, wobei prinzipiell unterschieden werden muss zwischen einer Entstehung als Komplikation einer direkten Lungenschädigung und, häufiger, als Folge einer extrapulmonalen Akuterkrankung (Abbildung 1).

Abbildung 1: Ursachen für die Entstehung eines ARDS

Direkte Lungenparenchym-Schädigung	Indirekte Lungenparenchym-Schädigung
<ul style="list-style-type: none"> • Diffuse Pneumonien (Mykoplasmen, Legionellen, viral, Pneumocystis carinii, etc.) • Beinahe Ertrinken • Reizgasinhalation (NO₂, Cl₂, NH₃, SO₂) • O₂-Toxizität • Aspiration von Magensaft (Mendelson-Syndrom) • Höhenkrankheit • Lungenkontusion • Organ-Reperfusion 	<ul style="list-style-type: none"> • Sepsis • SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) • Embolie (Fett, Luft, Fruchtwasser) • Polytrauma • Pankreatitis • Massivtransfusion • Verbrennungen • Schock • Schädel-Hirn-Trauma • Disseminierte intravasale Gerinnung • Kardiopulmonale Bypass-Operation • Narkotika-Intoxikation (z.B. Heroin)

2.1.4 Pathogenese des ARDS

Der initiale Mechanismus in der Pathogenese des „Acute Respiratory Distress Syndrome“ ist eine Schädigung der **alveolo-kapillären Membran**. Die verschiedenen Noxen können diese sowohl über die Atemwege als auch über die Blutbahn erreichen, das erste Ziel der Schädigung sind demnach entweder die **Gefäßendothelzellen** oder die **Alveolarepithelzellen**.

Die Folge ist ein Gefügeverlust des kapillären Endothels und des alveolären Epithels mit einer erhöhten Durchlässigkeit, in dessen Folge Wasser, großmolekulare Proteine, sowie Erythrozyten in das Interstitium und die Alveolen gelangen. Es entsteht ein interstitielles und alveoläres Lungenödem.

Gefördert wird dies durch eine Aktivierung verschiedenster Kaskadensysteme, wie dem Komplementsystem, dem Gerinnungssystem und dem Kinin-Kallikreinsystem. In deren Folge kommt es unter anderem zu einer Vermehrung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Thrombozyten im Entzündungsgebiet.

In den Kapillaren kommt es zur Freisetzung verschiedenster humoraler Mediatoren (9, 10) (Abbildung 2).

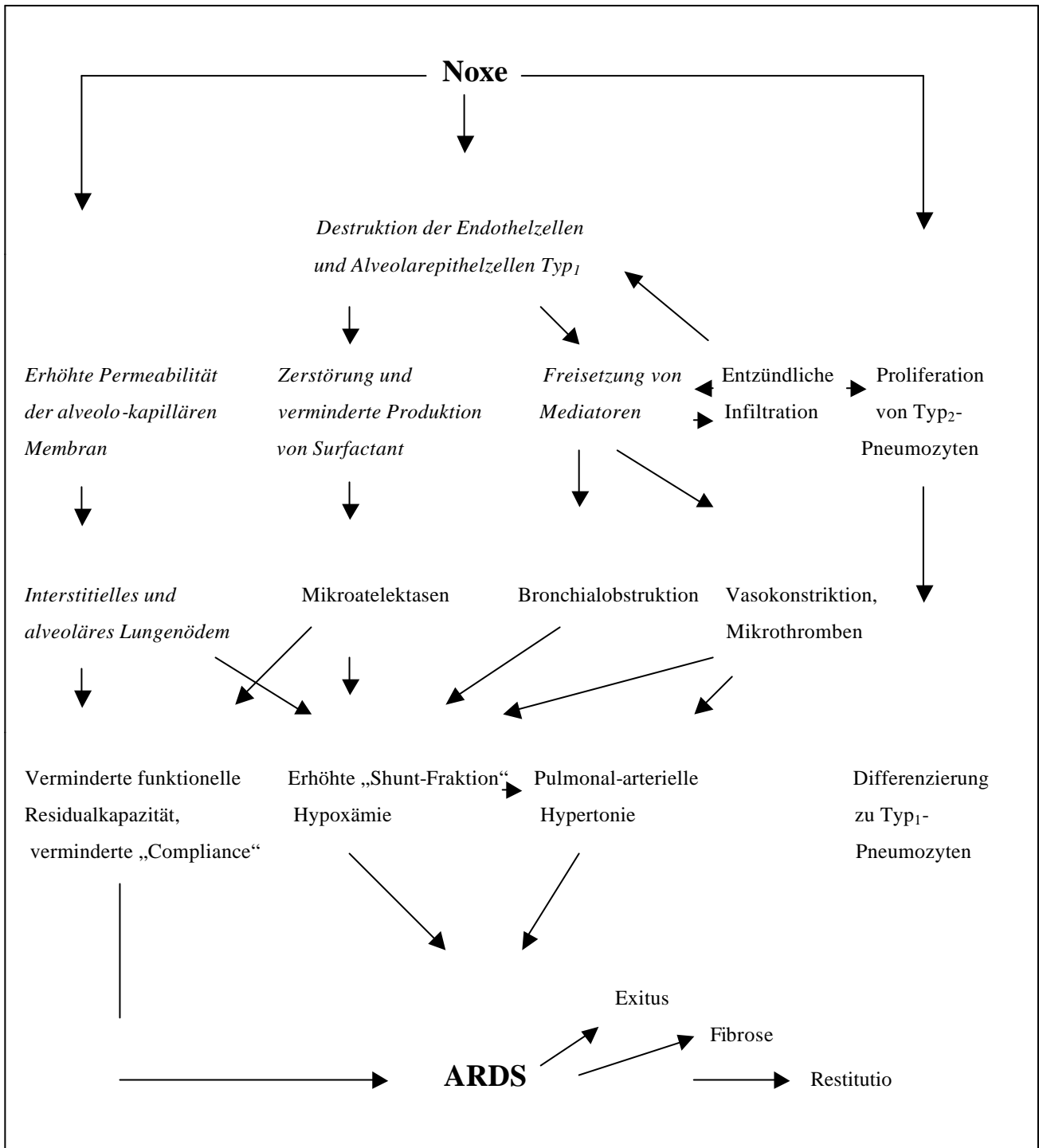
Abbildung 2: Freigesetzte Mediatoren bei der Entstehung des ARDS (nach 9, 10)

- Komplement
- Zytokine
- „Platelet Activating Factor“ (PAF)
- Prostaglandine (**PGE₂**, **PGI₂**)
- Reaktive O₂-Zwischenprodukte
- Kinine
- Fibrinolytische- bzw. Koagulationskaskade
- **VEGF**

Diese Freisetzung verstärkt wiederum die Ödembildung und führt zu einer pulmonalen Vasokonstriktion, zu Mikroembolisationen, Mikrothrombosierungen und zu einer Atelektasenbildung. Hieraus resultieren die typischen klinischen Merkmale der Gasaustauschstörung und der pulmonal-vaskulären Widerstandserhöhung.

Im Spätstadium dieser Erkrankung kann es zu der Ausbildung einer Lungenfibrose kommen (11) (Abbildung 3).

Abbildung 3: Pathophysiologie des ARDS (nach 11)



2.2 Morphologie und Aufbau der Alveole

2.2.1 Das Alveolarsystem

Die Struktur der Lunge ist einfach und klar aufgebaut. Sie gliedert sich in das luftleitende System und das Alveolarsystem. Die Gesamtfläche des Alveolarsystems beträgt in mittlerer Respirationslage 100 bis 140 m² und ist damit die größte Fläche des menschlichen Organismus, die in direktem Kontakt mit der Außenwelt steht (12, 13). Die gesamte Lunge besteht aus ca. 300 Millionen Alveolen, welche gleichmäßig von Epithel ausgekleidet werden (14).

Nach der äußeren Form der zytoplasmatischen Differenzierung lassen sich zwei Epithelzelltypen unterscheiden:

Die Alveolarepithelzellen Typ₁ (Typ₁-Zelle) und die Alveolarepithelzellen Typ₂ (Typ₂-Zelle) (15).

2.2.2 Alveolarepithelzellen Typ₁

Alveolarepithelzellen Typ₁ kleiden zu ca. 97 % die Oberfläche der Alveolen aus, obwohl sie nur 5-10 % der Gesamtzahl der Zellen des Lungenparenchyms ausmachen (16). Grund dafür ist das mit ca. 915 µm³ große Zellvolumen und die flache Ausbreitung des Zytoplasmaleibes (Flächenausdehnung 2300µm²) (17).

Die Typ₁-Zellen sind gekennzeichnet durch ihre Organellenarmut. Sie enthalten nur wenig endoplasmatisches Retikulum, vereinzelt Lysosomen, Mitochondrien und ein Golgi-Feld.

Der ovale Zellkern liegt im Zentrum der Zelle (18). Über unterschiedlich lange Strecken überlappen sich die flachen Zytoplasmaausläufer der Zellen, sie können sich in der Inspirations- und Expirationsphase gegeneinander verschieben. In diesen Ausläufern findet man in großer Zahl Pinozytosebläschen.

Die einzelnen Epithelzellen sind untereinander mittels sogenannter „tight-junctions“ verbunden. Die Alveolarepithelzellen Typ₁ bilden zusammen mit den mikrovaskulären Endothelzellen und der von ihnen gebildeten Basalmembran die Basis für den Gasaustausch an der Alveolarwand (19).

Die Typ₁-Zellen sind nicht in der Lage, sich mitotisch zu teilen. Im Falle einer Schädigung erfolgt die Erneuerung und Regeneration durch Umdifferenzierung einer Typ₂-Zelle in eine Typ₁-Zellen. Diese stellt somit die ausdifferenzierte Form dar (20,21).

2.2.3 Alveolarepithelzellen Typ₂

Die Alveolarepithelzellen Typ₂ machen 15 % der Lungenparenchymzellen aus. Aufgrund ihrer kubischen Form bedecken sie jedoch nur ca. 10 % der alveolären Oberfläche. Die Typ₂-Zellen haben einen Durchmesser von ca. 1 µm (16).

Sie kommen im Alveolarepithel teilweise in kleinen Gruppen von 2 bis 3 Zellen vor, meistens liegen sie aber einzeln im Epithelzellverband. Auf der apikalen Zelloberfläche tragen sie einen Besatz aus 0,1 µm breiten Mikrovilli (18). Wie bei den Typ₁-Zellen liegen die Zellkerne zentral, diese besitzen einen großen Nukleolus. Die Typ₂-Zellen sind über Desmosomen und „tight junctions“ mit den Typ₁-Zellen verbunden und werden von deren Zytoplasmaausläufern kragenförmig überlappt (18). Die Epitheloberfläche wird von den großen, kubischen Typ₂-Zellen nur wenig überragt.

Anders als bei den Alveolarepithelzellen Typ₁ ist jedoch ihr Besatz an Zellorganellen größer. Man findet einen gut entwickelten Golgi-Apparat, freie Ribosomen, Mitochondrien, Lysosomen, Multivesikularkörper und ein raues endoplasmatisches Retikulum (22).

Ein weiteres morphologisches Korrelat der Typ₂-Zelle ist das Vorhandensein von 0,2 µm bis 2 µm durchmessenden Lamellarkörpern, welche ca. 18 bis 24 % des Zytoplasmas der Zelle einnehmen (23).

Die Lamellarkörper stammen wahrscheinlich von den Multivesikularkörpern ab, welche die gleichen lysosomalen Enzyme enthalten. Die Lamellarkörper sind der intrazelluläre Speicherort der Phospholipide und Proteine, welche vom endoplasmatischen Retikulum gebildet und im Golgi-Apparat modifiziert werden (23,24). Die in den Lamellarkörpern vorhandenen Substanzen werden dann durch Exozytose in die Alveolarlichtung sezerniert (25,26). Dieser Vorgang, der für die Reduktion der Oberflächenspannung in der Alveole notwendig ist, kann als Charakteristikum der Typ₂-Zelle angesehen werden (27). Durch die Synthese und Sekretion von Surfactant wird der Kollaps der Alveolen verhindert.

2.3 Die Funktion der Alveolarepithelzelle Typ₂

Schon lange befindet sich die Typ₂-Zelle im Blickfeld der Forschung. 1954 postulierte CC Maecklin, dass die Alveolarepithelzelle Typ₂ in der Lage ist, eine Substanz zu sezernieren, welche die Oberflächenspannung der Alveole herabsetzt. Auch vertrat er die Ansicht, dass die Substanz eine Reinigungsfunktion für die Alveole besitzt und die Zelle sowohl ein Regulator des intraalveolären Flüssigkeitshaushaltes ist, als auch eine Rolle in der Bekämpfung infektiöser sowie toxischer Agenzien spielt (15).

Seit dieser Zeit ist die Funktion der Typ₂-Zelle Gegenstand intensiver Forschung geblieben.

2.3.1 Biosynthese und Funktion des Surfactants

Die Ergebnisse aus autoradiographischen Untersuchungen haben zu der Erkenntnis geführt, dass die Bausteine für das Surfactant die Typ₂-Zellen über das Blut erreichen (28).

Das Surfactant wird im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Golgi-Apparat modifiziert und dann in multivesikuläre Körperchen verpackt, aus denen die Lamellarkörper entstehen. Diese sind der intrazelluläre Speicherort für das Surfactant (29,30).

Es besteht aus Lipiden und Surfactant-spezifischen Proteinen, wobei der Lipidanteil 90 % beträgt. Den wesentlichen Anteil macht dabei Phosphatidycholin aus (70 % bis 80 % der Lipide), welches größtenteils als Dipalmitoylphosphatidycholin vorliegt. Sein Anteil macht etwa 50 % des gesamten Surfactantlipidgehaltes aus (31,32).

Der Anteil der Proteine beträgt ca. 10 % der Gesamtmenge. Die Proteine sind für die Funktion des Surfactants wichtig und unbedingt erforderlich. Man unterscheidet vier Surfactant-spezifische Proteine, zwei hydrophile (SP-A, SP-D) und zwei hydrophobe (SP-B, SP-C), welche sich in Aufbau und Funktion unterscheiden (33).

Das in den Lamellarkörpern gespeicherte Surfactant wird via Exozytose in das Alveolarlumen befördert (25). An der Regulation der Sekretion sind verschiedenste Faktoren bzw. Stoffe beteiligt. Mittels Versuchen an isolierten Typ₂-Zellen konnte gezeigt werden, dass z.B. mechanischer Stress und β -Agonisten an der Freisetzung beteiligt sind (34,35).

Das in die Alveole gelangte Surfactant wird dort in tubuläres Myelin umgewandelt und bildet den monomolekularen Film, der die Alveolen bedeckt.

Die gebrauchten Bestandteile werden wieder von den Typ₂-Zellen aufgenommen und in diesen „recycelt“ (36,37).

Die verschiedenen Surfactant-Proteine SP-A, SP-B, SP-C und SP-D haben verschiedenste Funktionen in der Alveole (33).

Der am längsten bekannte Mechanismus ist die Reduktion der Oberflächenspannung in der Alveole, was den Kollaps der Alveole besonders am Ende der Expiration verhindert. Dies ist nicht nur an der Alveolarwand, sondern auch zur Stabilisierung der peripheren Anteile des Bronchialsystems wichtig. Denn nur durch die Mitwirkung des Surfactants bei der Regulierung der Oberflächenspannung der Bronchiolen wird eine Anpassung der Lichtungsweite in der Inspirations – und Expirationsphase in diesen Arealen ermöglicht (38).

Doch auch im Rahmen von lokalen Abwehrmechanismen kommt dem Surfactant eine bedeutende Rolle zu, ist es doch ständig der Einwirkung infektiöser und toxischer Agenzien ausgesetzt (39,40).

Durch die Ausbildung einer gleichmäßigen Schicht über das gesamte Alveolarepithel verhindert es die Adhäsion partikulärer Bestandteile aus der Atemluft (41). Auf diese Weise wird das Eindringen infektiöser Agenzien, wie Bakterien und Viren, verhindert (42,43).

Auch wird durch die zyklischen Veränderungen der Oberflächenspannung während der Inspiration bzw. Expiration ein nach außen gerichteter, atemabhängiger Clearance-Mechanismus unterhalten (44).

Ebenso können durch Surfactant Makrophagen aktiviert und in ihrer Wirksamkeit erhöht werden, indem z.B. die Sekretion von Sauerstoff-Radikalen aus Makrophagen gesteigert wird (45,46). Desweiteren kann durch Surfactant die Migration von Makrophagen in Richtung des schädigenden Agens gefördert werden (47).

Aber es ist auch bekannt, dass Surfactant direkt mit Bakterien und Viren reagieren kann. Durch Bindung beispielsweise an Lipopolysaccharin (LPS) der Zellwand gram-negativer Bakterien (Opsonierung) wird die Phagozytose durch Makrophagen gefördert (48). Auch bei Herpes-simplex-Virus Typ I konnte gezeigt werden, dass Surfactant als Opsonin wirken kann (49).

Ein weiterer Mechanismus zur Abwehr von Mikroorganismen ist die Fähigkeit Bakterien zu agglutinieren und dadurch schneller durch den mukoziliären Transport nach außen zu befördern (50).

2.3.2 Reduktion der alveolären Flüssigkeitsmenge

Eine weitere wichtige Aufgabe der Alveolarepithelzellen Typ₂ besteht darin, überschüssige Flüssigkeit aus den Alveolen zu transportieren, um so einen ungehinderten Gasaustausch zu gewährleisten (51).

Noch in den 80-iger Jahren war man der Ansicht, dass der hydrostatische und der kolloidosmotische Druck für den Salz- und Flüssigkeitsstrom von der Alveole in das Lungeninterstitium verantwortlich ist, es also einen rein passiven Vorgang entlang eines Konzentrationsgradienten darstellt (52).

Erst als mit der Zeit *in vitro* und *in vivo* Modelle entwickelt wurden, anhand derer man die Mechanismen studieren konnte, wurde klar, dass neben passiven Transportmechanismen auch Mechanismen des aktiven Transportes existieren (53,54,55).

Zunächst einmal muss unterschieden werden zwischen der apikalen, der Alveole zugewandten und der baso-lateralen, dem Lungeninterstitium zugewandten Seite.

Die Na⁺-Ionen und mit ihnen H₂O gelangen über die apikale Seite in das Zellinnere. Dies stellt einen passiven Vorgang entlang eines Konzentrationsgradienten dar, wobei die Wege, über welche die Ionen die Alveolarzelle erreichen, vielfältig sind.

Am bedeutendsten scheint hierbei ein amilorid-sensitiver epithelialer Na⁺-Kanal (ENaC) zu sein (56).

Auf der baso-lateralen Seite der Typ₂-Zellen befindet sich eine Na⁺-K⁺-ATPase, die über die Hydrolysierung von ATP Na⁺-Ionen aus der Zelle heraus und K⁺-Ionen in die Zelle hinein pumpt. Dieser Vorgang spielt eine zentrale Rolle beim vektoriellen Transport von Na⁺-Ionen, da nur durch die Na⁺-K⁺-ATPase der transzelluläre elektrische Gradient aufrecht erhalten werden kann, der Motor für den Influx von Na⁺-Ionen auf der apikalen Seite ist (57,58).

2.3.3 Alveolarepithelzellen während der Inflammation

In diesem Abschnitt soll in einer kurzen Übersicht zunächst auf die Möglichkeiten der Typ₂-Zelle eingegangen werden, auf einen Entzündungsreiz zu reagieren und in das Entzündungsgeschehen einzugreifen.

Im Anschluss wird auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Arachidonsäure-Metaboliten PGE₂ und PGI₂ im Hinblick auf Synthese sowie Funktion genauer eingegangen.

Wie schon erwähnt, steht das Alveolarzellepithel mit seiner großen Oberfläche in ständigem Kontakt mit der Außenwelt. So verwundert es nicht, dass auch die Typ₂-Zellen imstande sind auf einen Entzündungsreiz zu reagieren (Abbildung 4).

Abbildung 4: Möglichkeiten der Alveolarepithelzelle auf Entzündungsreize zu reagieren

- Antigen-Präsentation
- Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren)
- Surfactant-Produktion
- Expression von Zelladhäsions-Molekülen
- Produktion von Arachidonsäurederivaten

Die Alveolarepithelzellen können in manchen Situationen als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und somit eine akzessorische Rolle bei der Entwicklung einer adaptiven Immunantwort spielen. Die zur Antigenpräsentation notwendigen Glykoproteine werden Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle genannt. Typ₂-Zellen sind in der Lage, MHC-Moleküle der Klasse II auf ihrer Oberfläche zu tragen und können so Peptidfragmente potentieller Krankheitserreger den T-Zellen präsentieren (58).

Ein weiterer Mechanismus ist die Expression von so genannten „intercellular adhesion molecules“ (ICAMs) auf der Zelloberfläche. Normalerweise ist ICAM-1, ein Vertreter der ICAM Familie, nur auf Typ₁-Zellen zu finden. Während der entzündlichen Reizung der Typ₂-Zellen kann es jedoch auch auf diesen zur Ausbildung von ICAM-1 Molekülen kommen. Dies scheint unter anderem wichtig zu sein für die Migration von Entzündungszellen aus dem Alveolarraum in das Lungeninterstitium, sowie für die Aktivierung von T-Lymphozyten. Ebenso scheint ICAM-1 eine Rolle im entzündungszell-vermittelten Zelltod zu spielen (59).

Desweiteren sind Typ₂-Zellen in der Lage eine Reihe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Komponenten des Komplementsystems zu synthetisieren und sezernieren, welche auf vielfältige Weise eine Entzündung beeinflussen können.

Untersuchungen an isolierten Alveolarepithelzellen Typ₂ der Ratte und des Menschen haben die Synthese der Komplementfaktoren C2, C3, C4, C5 sowie des Faktor B gezeigt. Die Aktivierung der Kaskade des Komplementsystems wirkt chemotaktisch auf Leukozyten, fördert die Phagozytose durch Makrophagen/Monozyten, bewirkt die Opsonierung von Mikroorganismen und kann durch Aktivierung des zytolytischen Komplexes C5b-C9 Zellen abtöten (60).

Zu den Zytokinen, die von Typ₂-Zellen freigesetzt werden können, zählt das MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Es wird als Reaktion auf das Einwirken von Bakterientoxinen freigesetzt, wirkt chemotaktisch auf Monozyten und es fördert sowohl den „oxidative burst“ von Granulozyten als auch das Durchwandern von Leukozyten durch die Blutgefäßwand (Extravasion) (61).

Weitere Zytokine, die gebildet werden können, sind z.B. Interleukin-3 (IL-3) und Interleukin-8 (IL-8), welche auch aktivierende Funktion auf Leukozyten besitzen.

Auch Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (granulocyte/monocyte colony-stimulating factor) werden während der Inflammation von Typ₂-Zellen gebildet. Sie begünstigen unter anderem die Proliferation von Makrophagen, die Chemotaxis und die Differenzierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. (59).

Darüber hinaus ist, wie in 2.2.1 schon näher beschrieben, das Surfactantsystem in der Lage, in das Entzündungsgeschehen einzugreifen.

2.4 Physiologische Funktionen der Endothelzelle

Die Endothelzellen des Gefäßsystems kleiden die Innenseiten der Blutgefäße aus. Sie bedecken beim Menschen eine Gesamtfläche von 4000-7000 m² und haben ein Gewicht von annähernd 1 kg. In der Lunge wird eine Fläche von 130 m² von mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen ausgekleidet, in deren Gefäßbett 215 ml Blut gehalten werden können (101).

Endothelzellen sind lange, flache Zellen, die in Längsrichtung zum Blutstrom ausgerichtet sind. Nur der Zellkern wölbt das Zellniveau in diesem Bereich vor. Ausgekleidet werden die Lungenkapillaren durch zusammenhängendes, nichtfenestriertes Endothel. Innerhalb der Zellen sind meist nur wenige Zellorganellen, wie Golgi-Apparat, Mitochondrien und rauhes endoplasmatisches Retikulum vorhanden (12). In den Lungenkapillaren beträgt die Dicke der Zellen ca. 0,2 µm. Sie haben eine durchschnittliche Oberfläche von ca. 1000 µm². Endothelzellen haben einen Anteil von 43 % an der Gesamtzahl der Zellen des Lungenparenchyms und sind damit der in der Lunge am häufigsten vorkommende Zelltyp (17).

Vaskuläre Endothelzellen vermitteln eine Reihe von Interaktionen zwischen Blut und Gewebe und spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung und Modulation von Gerinnungsvorgängen, in der Angiogenese, der Aufrechterhaltung einer Schrankenfunktion

gegenüber dem umgebenden Gewebe, der Wundheilung, bei inflammatorischen und immunologischen Prozessen, der Regulierung des Blutdrucks, der Entstehung der Artherosklerose, der Tumormetastasierung und, im Falle der mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge, des Gasaustausches in den Alveolen.

Das Endothel hat pro- und antikoagulatorische Fähigkeiten. Es synthetisiert verschiedene Faktoren (PGI_2 , ERDF, t-Pa, u-Pa, Protein S, Thrombomodulin), die antikoagulatorisch wirken und Faktoren, die prokoagulatorisch in die Gerinnungskaskade eingreifen können (Tissue Factor, PAF, Faktor V, PAI-1, Faktor IX/X-Rezeptor). Auch reguliert das Endothel die Thrombozyten-Aktivierung und –Adhärenz durch die Produktion von NO, PGI_2 , PAF und Thromboxan (102,103).

Die Vasomotorik wird auch durch Gefäßendothelzellen mitbeeinflusst. Sie sind in der Lage, gefäßverengende wie gefäßerweiternde Substanzen zu synthetisieren. Die bedeutendsten vasodilatativen Mediatoren, die von Endothelzellen produziert werden, sind PGI_2 und Stickstoffmonoxid (NO, ERDF). Die wichtigsten vasokonstriktiven Mediatoren sind Endothelin-1 und PAF (102,103).

Während des Entzündungsgeschehens ist das Endothel Syntheseort verschiedener inflammatorischer Mediatoren. Es steuert über die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 die Migration von Entzündungskomponenten in den Entzündungsfokus und fördert die Extravasion von Leukozyten (102,103).

Die aus mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge bestehenden Kapillaren sind der für den Gasaustausch entscheidende Gefäßabschnitt. Die sogenannte Blut-Luft-Schranke wird in der Lunge von den Endothelzellen, den Basalmembranen und dem Zytoplasma der Alveolarepithelzellen gebildet (12). Schäden auf der einen oder der anderen Seite dieser Schranke können zu schwerwiegenden Erkrankungen wie das oben erwähnte ARDS, der pulmonalen Hypertonie und der Lungenfibrose führen.

In der vorliegenden Arbeit soll aber in erster Linie nicht das Verhalten der mikrovaskulären Endothelzellen innerhalb der **alveolo-kapillären Membran** in dem *in vitro* Modell untersucht werden, sondern vielmehr das Verhalten der Typ_2 -Zellen innerhalb dieses Verbandes.

2.5 Synthese und Funktion der Arachidonsäurederivate PGE₂ und PGI₂

2.5.1 Synthese der Arachidonsäurederivate

Der Ausgangspunkt der Prostaglandinsynthese ist die Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure). Sie ist gekennzeichnet durch eine C-20 Fettsäurestruktur und ist in Phospholipiden von Zellmembranen enthalten. Aus der Membran ausgelöst wird die Arachidonsäure hauptsächlich durch die Phospholipase A₂ (PLA₂). Welche der verschiedenen Formen der PLA₂ für die Freisetzung verantwortlich ist, scheint vom Zelltyp und der Art der Stimulation abhängig zu sein.

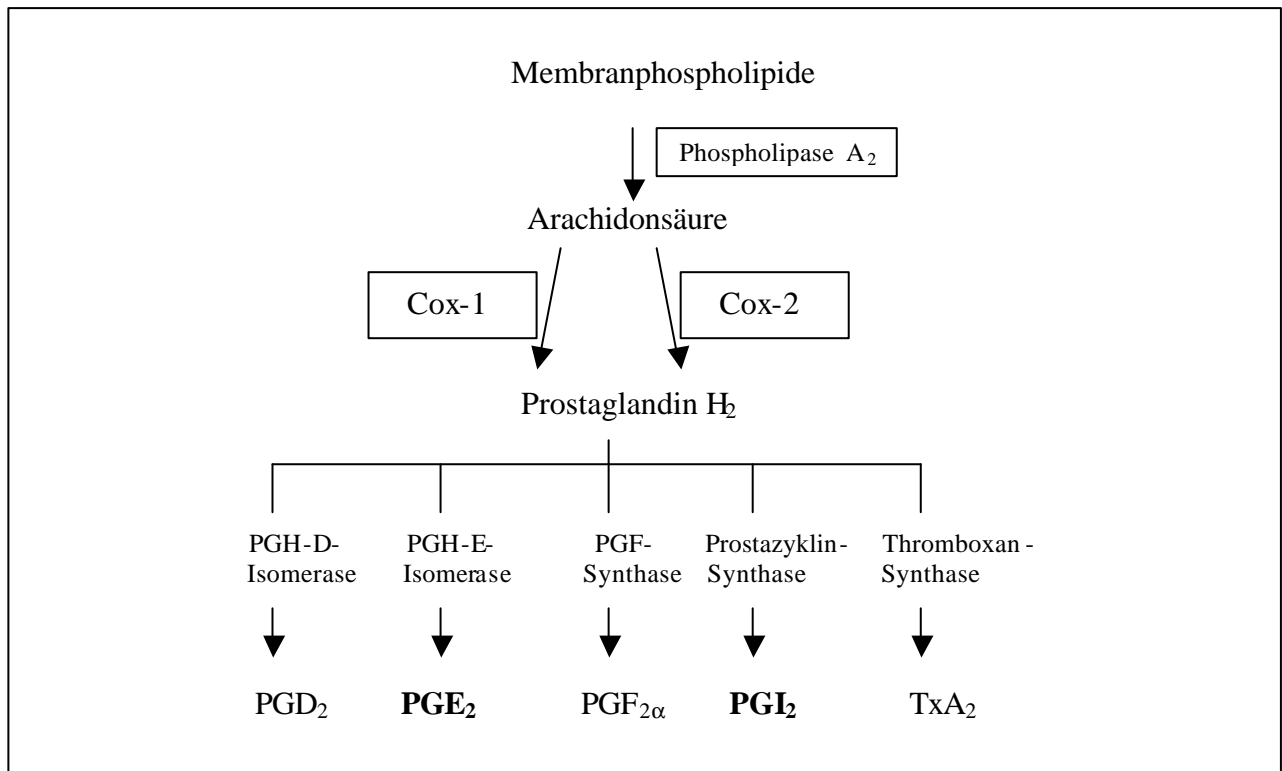
Der zweite Schritt in der Synthese der Arachidonsäurederivate ist die Umwandlung der freigesetzten Fettsäure in PGH₂. Hierfür sind zwei Prostaglandin-Endoperoxid H-Synthasen (PGH-Synthasen) verantwortlich. Bekannt sind diese Enzyme seit 1967. Die Erkenntnis, dass von diesem Enzym zwei Isoformen existieren, setzte sich aber erst in den 90-iger Jahren durch. Man unterscheidet auf der einen Seite die PGH-Synthase-1 (Cyclooxygenase-1; Cox-1) und auf der anderen Seite die PGH-Synthase-2 (Cyclooxygenase-2; Cox-2) (62) (Abbildung 5).

2.5.2 Funktion der Cyclooxygenasen

Die beiden Cyclooxygenaseenzyme werden von verschiedenen Genen codiert und besitzen Unterschiede hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und Expressionsregulation (Abbildung 6). In der Zelle befinden sich die beiden Isoformen hauptsächlich an der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums und im Zellkern (63).

Die Cox-1 ist nahezu ubiquitär vorhanden und kann als sogenanntes „house-keeping enzyme“ eine schnelle physiologische Adaptation einleiten (62). Die Cox-1 generiert vasodilatierende Prostaglandine, welche den renalen Blutfluss aufrechterhalten, sowie eine physiologische Zytoprotektion gewährleisten (64). Dem von aktivierten Thrombozyten freigesetzten vasokonstriktiven Thromboxan A₂ (TxA₂) wird der potente Vasodilatator Prostaglandin I₂ (PGI₂) entgegengesetzt (65).

Abbildung 5: Syntheseweg der Prostaglandine



Die Cox-2 hingegen wird erst auf einen Reiz hin hochreguliert und in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert. Durch Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), proinflammatorische Zytokine, Interferon- γ (IFN- γ), Endotoxine, Stickoxid (NO) und Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- β) kann die Expression von Cox-2 zum Teil erheblich gesteigert werden (141). Auch PGE₂, als ein Substrat des Enzyms, ist in der Lage, über nukleäre Rezeptoren die Cox-2-Expression zu steigern (142).

Herunterreguliert werden kann die Cox-2 durch antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10, auch Glukokortikoide können sie hemmen. Eine konstitutive Expression der Cox-2 findet sich in Gehirn, Hoden, Lunge und Macula densa der Nieren (66).

Durch die verzögerte Induktion wirkt die Cox-2 auf Prozesse wie Entzündung, Mitose und Ovulation sekundär verstärkend.

Abbildung 6: Unterschiede Cox-1 und Cox-2 (nach 69)

	Cox-1	Cox-2
Genlokus	9q32-q33.3	1q25.2-q25.3
Gengröße	22 kb 11 Exons	8 kb 10 Exons
Größe der mRNA	2,8 kb	4,0 kb
Molekulargewicht der Proteine	85.000 Da	72.000 Da

Ein Beispiel für die physiologische Funktion der Cox-2 ist die neonatale Entwicklung. Versuche mit Cox-2-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass diese im Verlauf des Wachstums schwere glomeruläre Schäden entwickeln. Auch der postpartale Verschluss des Ductus arteriosus Botalli scheint ein Cox-2-abhängiger Prozess zu sein (67).

Die Versuche an knock-out Mäusen haben gezeigt, dass die beiden Cyclooxygenasen sehr unterschiedliche Funktionen besitzen. So sind Cox-1-defiziente Mäuse wenig beeinträchtigt, obschon bei ihnen 99 % der Prostaglandinsynthese gehemmt ist. Cox-2-defiziente Mäuse hingegen haben eine hohe Frühsterblichkeit, obwohl die Prostaglandinsynthese kaum beeinträchtigt ist (68).

Beide Isoformen sind soweit voneinander unabhängig, dass sie ohne die Anwesenheit der anderen funktionsfähig sind. Auch konnte keine kompensatorische Hochregulation der einen bei Fehlen der anderen Cyclooxygenase festgestellt werden (67).

2.5.3 PG-Synthasen

Nach der Biosynthese von PGH_2 wird dieses Endoperoxid in eines der Prostaglandine umgewandelt. PGE_2 wird hierbei durch eine PGH-E-Isomerase durch einfaches, nicht-oxidatives Rearrangement und PGI_2 durch die Wirkung einer Prostazyklin-Synthase gebildet (70).

2.5.4 Wirkungen von PGE₂

Prostaglandine werden nach ihrer Synthese direkt aus der Zelle geschleust und können nicht gespeichert werden. Die Wirkung ist auf benachbarte Zellen beschränkt. PGE₂ wird eine große Zahl unterschiedlicher Wirkungen zugeschrieben, die durch verschiedene Rezeptoren bedingt sind (Abbildung 7). Für die Wirkung von PGE₂ werden insgesamt vier verschiedene G-Protein-gekoppelte-Rhodopsin-Rezeptoren verantwortlich gemacht (EP-1, EP-2, EP-3, EP-4), die je nach Art des Rezeptor-G-Protein-Komplexes stimulierend (G_s) oder inhibierend (G_i) auf den second-messenger cAMP wirken (EP-2 bis EP-4). Der PGE₂-Rezeptor EP-1 erhöht dagegen die intrazelluläre Ca⁺-Konzentration über G-Proteine der G_q-Familie (71) (Abbildung 8).

Abbildung 7: Verteilung und Funktion der PGE₂-Rezeptoren (modifiziert nach 72)

Rezeptor	Gewebeverteilung	Funktion
EP-1	Niere, Lunge, Milz Hoden, Uterus	Kontraktion der glatten Muskulatur
EP-2	Lunge, Plazenta	Relaxation der glatten Muskulatur
EP-3	Magen Niere Uterus Hoden, Lunge Nebenniere, GIT	Hemmung der Säuresekretion Hemmung der Wasserabsorption Uteruskontraktion Kontraktion der glatten Muskulatur
EP-4	Lunge, GIT, Uterus	Relaxation der glatten Muskulatur

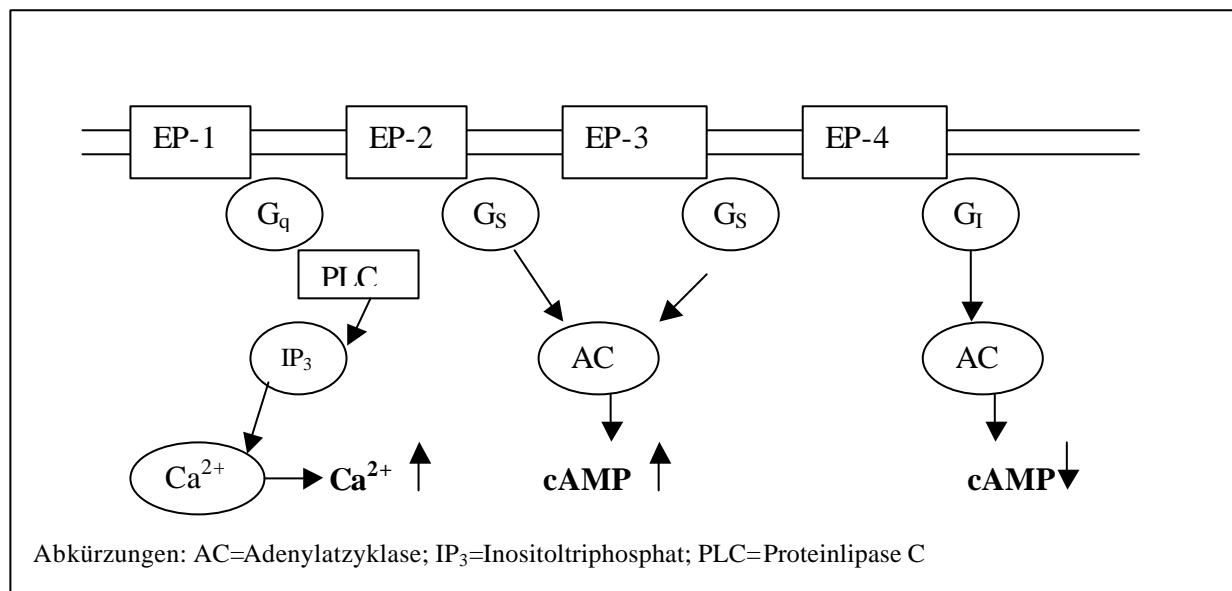
Viele physiologische Funktionen von PGE₂ sind bekannt. So wirkt es zytoprotektiv auf die Magenschleimhaut, indem es die Sekretion der Magensäure hemmt und im Magen-Darm-Trakt die Hydrogencarbonat- und Schleimsekretion erhöht. Auch steigert es die Motilität im Magen-Darm-Trakt. An der Niere fördert PGE₂ den renalen Blutfluss und die Diurese. Auch für die Ovulation hat PGE₂ eine wichtige Bedeutung, wie Davies et al. (73) an Mäusen zeigen konnte. Desweiteren führt PGE₂ zu einer Kontraktion der Uterusmuskulatur und damit zu einer Weheninduktion.

Auch im Rahmen der Entzündung kommt PGE₂ eine bedeutende Rolle zu. Es ist ein potenter Vasodilatator und verstärkt die Ödeminduktion von Bradykinin und Komplementfaktor C5a (74). Auch werden durch PGE₂ die Nervenendigungen für Histamin und Bradykinin

sensibilisiert, was für die Schmerzentstehung verantwortlich ist. Die Sekretion von Prostaglandinen ist also für einen großen Teil der klassischen Entzündungssymptome Dolor, Rubor, Calor und Tumor verantwortlich. Desweiteren ist PGE_2 ein wichtiger zentraler Fiebermediator. Es führt auf der einen Seite direkt zu einer „Sollwertverstellung“ im ZNS und damit zum Temperaturanstieg und auf der anderen Seite indirekt zu einer Fieberinduktion durch eine Förderung der Interleukin-1 (IL-1)-Freisetzung (12).

PGE_2 spielt jedoch nicht nur in akuten Verläufen eine Rolle, auch auf chronische Entzündungen wie Parodontitis und die chronische Polyarthritis nimmt es Einfluss (75).

Abbildung 8: Signalübertragungswege der PGE_2 -Rezeptoren (modifiziert nach 76)



Eine weitere wichtige Funktion von PGE_2 ist die Fähigkeit zur Modulation des Immunsystems; T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen (APC) können von PGE_2 beeinflusst werden.

T-Lymphozyten können beispielsweise in ihrer Proliferation von PGE_2 gehemmt werden. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt. Choudhry et al. (77) haben gezeigt, dass PGE_2 in T-Lymphozyten die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und die Aktivität der p59(fyn)-Tyrosinkinase hemmt. Auch scheint es während der Entzündung zu einer Hochregulation des EP-4 Rezeptors auf T-Lymphozyten zu kommen. Dies führt zu einer reduzierten Interleukin-2 (IL-2)-Produktion in den Zellen. IL-2 fördert die Proliferation bei T-Lymphozyten, ein Mangel hemmt demnach die Lymphozytenproliferation (78).

Weiterhin ist PGE_2 wichtig für die Regulation der Apoptose in T-Lymphozyten. In unreifen $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ doppelt positiven Thymozyten und in inaktiven reifen T-Lymphozyten fördert es

den Zelltod, es schützt jedoch vor der durch die Aktivierung der T-Zelle bedingten T-Zell-Rezeptor vermittelten Apoptose (79).

Auch die Zytokin-Produktion von T-Lymphozyten wird durch PGE₂ beeinflusst. Es hemmt in CD4⁺-Zellen die Produktion von IL-2 und IFN- γ und in CD8⁺-Lymphozyten wird die Produktion von IFN- γ gesenkt. Andererseits wird die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 erhöht. PGE₂ spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aktivität von B-Lymphozyten. Auf unreife B-Zellen wirkt es proliferationshemmend und apoptosefördernd, bei reifen B-Lymphozyten hingegen hemmt es die Apoptose und hat einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation. Auch fördert PGE₂ die Produktion von IgG1 und IgE und hemmt die Zellvergrößerung und die Überexpression von MHC-II-Molekülen in LPS- und IL-4-stimulierten B-Zellen (76).

Für eine adäquate Immunantwort sind neben B-Lymphozyten und T-Lymphozyten auch antigenpräsentierende Zellen (APC) wichtig, wobei besonders den dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen eine wichtige Aufgabe zukommt. Auch hier ist die Wirkung von PGE₂ wieder abhängig vom Entwicklungsstand der Zellen. So werden DC's in der Peripherie durch PGE₂ aktiviert, wo sie Antigene aufnehmen und sie zu einem lymphatischen Organ transportieren. Auf APC's, die sich schon in lymphatischen Geweben befinden, scheint PGE₂ hingegen einen hemmenden Einfluss auszuüben. Auch senkt PGE₂ in DC's die Produktion von TNF- α , IL-1 β , IL-12 und IL-12R. In Makrophagen wird die IL-10-Sekretion gefördert und die IL-12-Sekretion gehemmt (80,81).

Auch in der Kanzerogenese scheint PGE₂ eine gewichtige Rolle zu spielen. In verschiedenen Tumoren, darunter Karzinome der Brust, des Kolons und der Prostata, wurde die Cyclooxygenase-2 vermehrt exprimiert, auch war die Konzentration von PGE₂ in Tumorgewebe höher als in normalem Gewebe (82).

PGE₂ hemmt in Tumorzellen die Apoptose, fördert die Tumorzellproliferation und Invasion, unterstützt die Angiogenese und fördert über die Induktion von Metalloproteinasen die Metastasierung (83,84).

Wie oben beschrieben ist PGE₂ in akuten und chronischen Entzündungen ein wichtiger Mediator. Anders als im übrigen Körpergewebe wird PGE₂ in der Lunge jedoch eine vorwiegend entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben. Dies hat Einfluss auf Erkrankungen wie das Asthma bronchiale, die Lungenfibrose und die Hypersensitivitäts-Pneumonitis (Abbildung 9).

Das allergische Asthma bronchiale ist charakterisiert durch ein hyperreagibles Bronchialsystem, eine Bronchokonstriktion sowie eine Entzündungsreaktion. PGE₂ hemmt beim Asthma bronchiale die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie Histaminen, Leukotrienen und PGD₂. Auch führt es zu einer Dilatation der Bronchialmuskulatur, indem es die Synthese der bronchokonstriktorisch wirkenden Mediatoren TxA₂ und der Leukotriene hemmt (85,86).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass PGE₂ Einfluss auf T-Lymphozyten nimmt. Die Einwanderung von T-Lymphozyten in das Entzündungsgebiet und die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen ist ein wichtiger pathogenetischer Mechanismus von Lungenerkrankungen wie der Lungenfibrose und der Sarkoidose. PGE₂ hemmt die Migration und Adhäsion von T-Lymphozyten im Entzündungsgebiet. Es stabilisiert die endotheliale Barriere und hemmt die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 auf glatten Muskelzellen der Bronchialwand sowie ECAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen (87).

Ebenso konnte von Typ₂-Zellen synthetisiertes und sezerniertes PGE₂ als ein bedeutender inhibitorischer Faktor der Fibroblastenproliferation identifiziert werden. Moore et al.(88) konnten mittels CC-chemokine-2-Rezeptor (CCR2)-negativen knockout-Mäusen die hemmende Wirkung zeigen. Die Bindung von MCP-1 an den CCR2-Rezeptor hemmt die PGE₂-Sekretion der Typ₂-Zellen. Bei den CCR2-defizienten Mäusen kam es nicht zu einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose. Die PGE₂-Sekretion war jedoch im Vergleich zu den CCR2-positiven Kontrollmäusen erhöht.

Abbildung 9: Wirkungen von PGE₂ in der Lunge (modifiziert nach 87)

Rezeptor	Funktion
EP-1	Stimulation der Surfactantsynthese von Typ ₂ -Zellen Förderung der Epithelregeneration
EP-2	Hemmung der Lymphozytenproliferation Relaxation der Bronchialmuskulatur Hemmung der TGF- β -induzierten Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten
EP-4	Förderung der Epithelregeneration Hemmung der Zytokinsekretion von Makrophagen

Auch wird durch PGE₂ die für die Pathogenese der Lungenfibrose wichtige Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten und die Kollagensynthese gehemmt. Die Sekretion von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Zytokinen wie IL-1, TNF- α und TGF- β wird vermindert. Auf der anderen Seite kommt es zu einer vermehrten Sekretion von IL-10. IL-10 hemmt zum einen ebenfalls die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, es hat aber auch eine direkte inhibitorische Wirkung auf die Fibroblastenproliferation und die Kollagensynthese (87).

Eine weitere Wirkung von PGE₂ in der Lunge ist die von Morsy et al. (89) gezeigte vermehrte Surfactantsekretion von Typ₂-Zellen.

2.5.5 Wirkung von PGI₂ (Prostazyklin)

Wie PGE₂ kann PGI₂ (Prostazyklin) nur *de novo* synthetisiert und nicht gespeichert werden. Es kann von verschiedensten Zellen gebildet werden und entfaltet seine Wirkung wie PGE₂ nur lokal. Anders als alle anderen Prostaglandin-Derivate wird PGI₂ während der Lungenpassage nicht enzymatisch inaktiviert, sondern es zerfällt wie TxA₂ in inaktive Metaboliten (90).

Die Wirkung von PGI₂ wird, soweit heute bekannt, über nur einen Rezeptortyp vermittelt. Der sogenannte IP-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der seine Wirkung über eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung entfaltet. Der IP-Rezeptor wurde hauptsächlich auf Thrombozyten, glatten arteriellen Muskelzellen und Nervenzellen gefunden (91,92).

Ähnlich wie PGE₂ fördert PGI₂ die Hydrogencarbonat- und Schleimsekretion des Magens. Ebenso wird durch Prostazyklin die durch Pentagastrin stimulierte Magensäuresekretion gehemmt und wirkt aufgrund dieser Wirkmechanismen wie PGE₂ zytoprotektiv auf die Magenschleimhaut (90).

Weiterhin scheint PGI₂ auch Entzündungsreaktionen zu beeinflussen. Versuche an IP-Rezeptor-negativen knockout-Mäusen (IP^{-/-}-Mäusen) haben gezeigt, dass die Permeabilitätserhöhung der Gefäßwand im Rahmen einer Entzündung auch durch PGI₂ bedingt ist. Murata et al (93) zeigten in ihren Experimenten, dass sich die Bradykinin-induzierte Permeabilitätserhöhung durch PGI₂ potenzieren lässt, diese Wirkung bei IP^{-/-}-Mäusen jedoch nicht mehr zu beobachten war. Auch wurde gezeigt, dass die Ödembildung nach Injektion von Carrageenin PGI₂-abhängig ist. IP-Rezeptor-positive Mäuse wiesen ein um ca. 50 % höheres Ödemvolumen als IP^{-/-}-Mäuse und als Mäuse, die vorher mit dem Cyclooxygenasehemmer Indometacin behandelt wurden, auf.

Desweiteren konnte von Murata et al. (93) gezeigt werden, dass auch der Entzündungsschmerz ein PGI_2 -abhängiger Prozess ist.

Schon seit langem ist bekannt, dass PGI_2 eine direkt vasodilatatorische Wirkung zugesprochen wird und nach intrakutaner Injektion zu einem lang anhaltenden Erythem führt. An den Bronchien wirkt es relaxierend und hat einen entscheidenden Einfluss auf den pulmonalen Gasaustausch. Sowohl Thrombozyten als auch Granulozyten werden durch PGI_2 in ihrer Funktion beeinträchtigt. Es nimmt damit die Rolle des funktionellen Gegenspielers von TxA_2 ein, welches vasokonstriktiv und thrombozytenstimulierend wirkt (94).

2.6 Synthese und Funktion von VEGF

VEGF wurde von Senger et al. (95) 1983 zunächst als VPF (vascular permeability factor) erstmals beschrieben, 1989 wurde dieser Stoff dann als VEGF, vascular endothelial growth factor, identifiziert.

Das humane VEGF-Gen besteht aus acht Exons, sieben Introns und hat eine Größe von 14 kb. Das Gen ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert. VEGF ist ein Glykoprotein mit einer Gesamtgröße von 45 kDa. Aufgrund der verschiedenen Aminosäure-Anordnungen unterscheidet man fünf verschiedene VEGF-Isoformen - das VEGF_{121} , VEGF_{145} , VEGF_{165} , VEGF_{189} und das VEGF_{206} , – wobei VEGF_{165} die am häufigsten vorkommende Isoform darstellt (96).

VEGF kann von einer Vielzahl verschiedener Zellen synthetisiert werden, darunter auch Type_2 -Zellen und Makrophagen der Lunge. Die Wirkung von VEGF ist hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, auf Endothelzellen beschränkt.

Die Effekte von VEGF können über die Rezeptoren Flt-1 (*fms*-like tyrosine kinase 1), KDR/Flk-1 (fetal liver kinase 1), Flt-4 und Neuropilin vermittelt werden, den beiden erstgenannten Rezeptoren wird dabei jedoch die weitaus größere Bedeutung zugeschrieben (96).

VEGF spielt eine wichtige Rolle in einer Reihe physiologischer wie pathologischer Prozesse. Es ist ein spezifisches Endothelzell-Mitogen, beeinflusst die Differenzierung von Endothelzellen und fördert die Angiogenese sowie die Entwicklung von Blutgefäßen. Zusätzlich wird ihm eine positive Wirkung im Hinblick auf die Durchlässigkeit des Endothels zugeschrieben.

Nicht endothelzell-spezifische Wirkungen von VEGF sind die Möglichkeit, die Chemotaxis von Monozyten zu fördern und die Reifung von antigen-präsentierenden Zellen zu hemmen. VEGF soll ebenfalls vasodilatatorische Funktion haben (96).

Im pathologischen Geschehen fördert VEGF vor allem die Angiogenese und die Neovaskularisation. In vielen Tumoren, z.B. Karzinomen der Lunge, Brust und Niere, wurden erhöhte Werte an VEGF-mRNA festgestellt. Auch im Rahmen des Diabetes mellitus und der rheumatoiden Arthritis spielt VEGF eine Rolle (96).

Weiterhin hat VEGF auch eine Bedeutung bei pathologischen Geschehen in der Lunge. Thickett et al. (97,98) haben gezeigt, dass die VEGF-Konzentrationen bei Patienten mit einem ARDS und gesunden Probanden differieren. Sie konnten nachweisen, dass die Plasmakonzentrationen bei Patienten mit ARDS höher, die Konzentrationen im Alveolarraum jedoch niedriger sind als in der Vergleichsgruppe.

VEGF soll im Rahmen des ARDS vor allem an der Entstehung des Lungenödems beteiligt sein. So konnte gezeigt werden, dass VEGF die Endothelzell-Permeabilität fördert und der Albuminflux über einen Endothelzellmonolayer signifikant erhöht wird (99).

Auch für die Regeneration des durch ein schädigendes Agens zerstörten mikrovaskulären Endothels soll VEGF eine entscheidende Bedeutung haben. Maniscalco et al. (100) konnten am Beispiel eines hyperoxischen Schadens zeigen, dass es nach Schädigung der Endothelzellen zu einem Anstieg der VEGF-mRNA in den benachbarten Typ₂-Zellen kommt.

2.7 Synthese und Funktion von Stickstoffmonoxid (NO)

1980 wurde eine Substanz entdeckt, die aus Endothelzellen freigesetzt wird und zur Relaxation von glatten Gefäßmuskelzellen führt (113). Nachdem man zunächst, nach Entstehungsort und Wirkung, diesem Stoff den Namen „endothelial derived relaxing factor (ERDF)“ gegeben hatte, fanden Furchtgott (113) und Ignarro (114) unabhängig voneinander heraus, dass es sich bei dieser Substanz um Stickstoffmonoxid (NO) handelt.

NO wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet, darunter Makrophagen, Chondrozyten und Endothelzellen. Einziges physiologisches Substrat als Ausgangspunkt der Synthese ist die essentielle Aminosäure L-Arginin, welche über einen kationischen Aminosäuretransporter in die Zellen aufgenommen wird. Dort wird sie dann durch NO-Synthasen (NOS) in zwei Schritten zu NO umgewandelt (115).

Verschiedene Isoformen des Enzyms konnten bis heute identifiziert werden. Unterschieden werden auf der einen Seite die konstitutive Form (cNOS), die ständig NO im picomolaren Bereich freisetzt, und auf der anderen Seite die induzierbare Form (iNOS), welche auf bestimmte Stimuli, wie beispielweise Entzündungsmediatoren (z.B LPS, Zytokine), schnell größere Mengen NO im nanomolaren Bereich freisetzen kann. Die in Endothelzellen vorkommende konstitutive Isoform wird als eNOS bezeichnet (115). NO besitzt eine besonders kurze Halbwertszeit von ca. 30 Sekunden und wird durch Superoxid-Anionen inaktiviert bzw. durch Superoxiddismutase geschützt.

NO kann durch Zellmembranen diffundieren, weshalb keine extrazellulären NO-Rezeptoren nötig sind. Innerhalb der Zellen kann es Guanylatzyklase-abhängig und –unabhängig wirken, wobei die Guanylatzyklase-abhängigen Mechanismen bis heute besser verstanden sind. NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase durch Anlagerung an die Eisenbindungsstelle von Hämproteinen. Durch diesen Schritt wird GTP in cGMP umgewandelt, welches seinerseits via Proteinphosphorylierung durch cGMP-abhängige Kinasen zu einer Vielzahl von NO-assoziierten Effekten führt (116, 117).

NO wird eine bedeutende anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben. Es hemmt die Lymphozytenproliferation, die Plättchenaggregation, sowie die Bildung von Oxidantien durch Phagozyten. Hinsichtlich der Relaxation von glatten Muskelzellen gleicht die Wirkung von NO den vasoaktiven Eigenschaften von PGI_2 . Auch konnte NO eine protektive Rolle bei pathologischen Ereignissen mit einer vermehrten Bildung von ROS (reactive oxygen species) zugeschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass die exogene NO-Applikation oder die Stimulation der endogenen NO-Freisetzung die Schwere von Gewebsschäden, z.B. in pulmonalen, renalen und inflammatorischen Modellen, auf molekularer und funktioneller Ebene mildern kann (118, 119).

Doch auch in pathologische Prozesse kann NO eingreifen. So spielt es eine Rolle in der Pathophysiologie der Arteriosklerose und es kann bei überschießender Freisetzung während der Entzündung zu einem durch Vasodilatation bedingten Ödem und Erythem führen (117).

2.8 Der elektrische Widerstand als Differenzierungsmarker im epithelialen Zellverband der Alveolarepithelzellen

Im Rahmen der Etablierung der alveolo-kapillären Membran *in vitro* sollte neben dem Verhalten der Parameter PGE_2 , PGI_2 und VEGF auch die Entwicklung der Widerstände in diesem System in Bezug auf die Widerstandsentwicklung der Typ_2 -Zellen betrachtet werden.

Der epitheliale Widerstand ist eine Größe, die als Ausdruck eines funktionierenden Layers betrachtet werden kann. Aufgrund der durch die Epithelzellen gebildeten interzellulären Kontakte, wie „tight-junctions“, kann durch das Epithel elektrischer Strom fließen. Nach dem Ohmschen Gesetz ist der dabei auftretende elektrische Widerstand direkt proportional zur Spannung (U) und umgekehrt proportional zur Stromstärke (I) (104).

Vor dem Hintergrund des epithelialen Charakters von Typ_1 -Zellen lässt sich durch dieses Verfahren eine Aussage über den Hauptteil des vorliegenden Zelltyps der Alveolarepithelzelle im untersuchten Well treffen.

Da die Typ_2 -Zellen eine kuboidale Zellform aufweisen und vorwiegend vereinzelt vorkommen, ist bei ihnen die Fähigkeit, einen epithelialen Layer - mit den dafür nötigen Zellkontakten - aufzubauen, geringer ausgeprägt als bei den Typ_1 -Zellen. Aus diesem Grund fällt bei Typ_2 -Zellen der Widerstand rasch ab (105, 106).

Aufgrund dieses Verhaltens lässt sich eine Aussage anhand der Widerstände über die Differenzierung der Alveolarepithelzellen im Zeitablauf formulieren.

2.9 Fragestellung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage nach den Auswirkungen einer Ko-Kultivation von Typ₂-Zellen der Lunge mit mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen auf die Freisetzung der inflammatorischen Parameter PGE₂ und PGI₂. Diese beiden Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des ARDS auf der Ebene der alveolo-kapillären Membran, sowie auch in der Therapie dieses Krankheitsbildes. Desweiteren sollten die Auswirkungen auf den auch im Rahmen des ARDS vermehrt freigesetzten pro-angiogenetischen Mediator VEGF, sowie die Entwicklung des elektrischen Widerstandes als Marker der Typ₂-Zell-Differenzierung in dem entwickelten Ko-Kultur-Modell untersucht werden.

Hierfür wurden Typ₂-Zellen der Ratte und des Menschen auf die eine Seite und HLMEC auf die andere Seite einer Transwellmembran ausgesät. Verglichen wurden die hierbei gemessenen Werte für PGE₂, PGI₂, VEGF, sowie die Entwicklung des elektrischen Widerstandes mit mono-kultivierten Typ₂-Zellen und mono-kultivierten HLMEC.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welche Auswirkung hat die Ko-Kultur von Epithelzellen und Endothelzellen der Lunge auf die Freisetzung der inflammatorischen Parameter PGE₂ sowie PGI₂ in den Typ₂-Zellen?
2. Welchen Einfluss hat das Ko-Kultur-System auf die Sekretion des pro-angiogenetischen Faktors VEGF?
3. Welchen Einfluss haben die Cyclooxygenasen-1 und -2 auf die eventuell veränderte Freisetzung von PGE₂ und PGI₂?
4. Welche Transduktionswege lassen sich für die veränderte Freisetzung von PGE₂ und PGI₂ herausarbeiten? Ist Stickstoffmonoxid (NO) ein möglicher Mediator?

5. Welche Mechanismen lassen sich für die veränderte Freisetzung von VEGF im Ko-Kultur-System erkennen?
6. Auf welche Weise verändert sich der elektrische Widerstand in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode (Mono-Kultur vs. Ko-Kultur) der Typ₂-Zellen?

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial

- Antibiotika (Gentamycin, Penicillin G) lyophilisiert, steril, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Aqua tridestillata – im Milli-Q-Wasseraufbereitungssystem, Millipore (Eschborn, Deutschland) entionisiert und gefiltert
- D-(+)-Glucose, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Fibronectin, Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), mit Aqua dest. und NaCl gelöst, steril filtriert, hiermit wurden die verschiedenen Zellkulturplatten für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Endkonzentration von 50µg/ml beschichtet
- EGTA (Chelator mit erhöhter Calcium-Selektivität), Ethylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,N-tetraessigsäure zur Analyse lieferte Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
- HEPES (Gewebskulturpuffer) N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphonsäure „cell culture tested“ von Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Immunglobulin, purified Rat IgG-Technical Grad von Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Isotonische Kochsalzlösung und Ringerlösung, steril und pyogenfrei, Braun (Melsungen, Deutschland)
- L-Glutamin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Pufferbestandteile in der Qualität „cell culture tested“: Di-Natriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Glucose, Calciumchlorid und Magnesiumsulfat von Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Snapwell culture inserts, Polycarbonate (pore size 0,4µm; 12mm Durchmesser) von Costar Corning (U.S.A)
- Silikonringe (Länge 1cm, 12mm Durchmesser), eigene Herstellung aus Silikonschlauch
- TRIS, Trihydroxyaminomethan p.A. Merck (Darmstadt, Deutschland)

- Bicarbonat (NaHCO_3), Elektrolytkonzentration 8,4% Braun (Melsungen, Deutschland)
- DMEM (Dulbeccos modified eagle Medium), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- MCDB 131, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Heparin, 1600 U/100ml, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- PBS, „Phosphat buffered saline“, Seromed (Berlin, Deutschland)
- ECGF, Endothelzellwachstumsfaktor, Promocell (Heidelberg, Deutschland)
- Filter (0,2 μm), Nalene (Hereford, U.K.)
- Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Zellkulturflaschen T-25 (25cm²) und T-75 (75cm²), Nunc (Bieberich, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen, Greiner (Nürtingen, Deutschland)
- Kollagen R
- RPMI 1640, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Biocoll Separation Solution, Biochrom KG (Berlin, Deutschland)

3.1.2. Enzyme, Sera und Antikörper

- Anti-CD3-beads, Immunotech (Hamburg, Deutschland)
- Anti-CD14-beads, Immunotech (Hamburg, Deutschland)
- Avidin-Texas Red, Vector Laboratories (Burlingame, U.S.A)
- Desoxyribonuclease I (DNase I) Typ DN 25, lyophilisiert, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Elastase Typ EC 134 aus Schweinepankreas, chromatographisch gereinigt, salzfrei, lyophilisiert, wasserlösliches Pulver, spezifische Aktivität 135 U/mg Protein (Orcein-Elastin) von Elastin Products Company (St.Louis, Missouri, U.S.A)
- Goat-anti-mouse-IgG-FITC, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Goat-anti-rabbit-Alexa 555, Molecular Probes (Eugene, U.S.A)
- Trypsin Typ III aus Rinderpankreas; kristallisiert, dialysiert, lyophilisiert, „essentially salt free“, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Dispase II, lyophilisiert, Böhringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)
- FCS, fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C, steril filtriert, Gibco (Karsruhe, Deutschland)
- HS, humanes Serum, Promocell (Heidelberg, Deutschland)

- Maclura pomifera-Lektin, biotinyliert, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Mouse-anti-mammals Cytokeratin 18, clone RGE 53, Monosan (Uden, Niederlande)
- Mouse-anti-human von Willebrand Faktor, Dako (Hamburg, Deutschland)
- Rabbit-anti-human, rat, mouse pSPC, Chemicon (Temecula, U.S.A)

Die zur Isolierung der Zellen aus humanen Lungen und Rattenlungen benötigten Pufferlösungen wurden kurz vor dem Gebrauch aus Stammlösungen hergestellt und steril filtriert. Sie setzen sich wie folgt zusammen:

Isolation Rattenlunge:

Lösung 1: 140 mM NaCl, 5,5mM KCL, 2,6 mM NaH₂PO₄, 10mM HEPES, 6 mM Glucose, 0,5 mM EGTA, ph: 7,42

Lösung 2: 140 mM NaCl, 5,5mM KCL, 2,6 mM NaH₂PO₄, 10mM HEPES, 6 mM Glucose, 2,2 mM CaCl₂, 1,3 mM MgSO₄, ph: 7,42

Isolation humane Lunge:

Lösung 1 : NaCl 7,95 g/l, KCL 0,4 g/l , Glucose 1,11 g/l, Na₂HPO₄ 0,46 g/l, HEPES 2,38 g/l

Lösung 2 : NaCl 7,95 g/l, KCL 0,4 g/l , Glucose 1,11 g/l, Na₂HPO₄ 0,46 g/l, HEPES 2,38 g/l, CaCl₂ x 2 H₂O 0,28 g/l, MgSO₄ x 7 H₂O

3.1.3 Pharmaka und Agenzien

- Entellan, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Erythrosin B, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Harris Haematoxylin, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Liquemin N 25000 (Antikoagulanzen) = Heparin, Hoffmann La Roche (Grenzach-Whylen, Deutschland)
- Nembutal (Narkotikum) = Pentobarbital-Natrium 6mg/ml, Sanofi-CEVA Importgesellschaft (Hannover, Deutschland)
- Spermine NONOate (NOC-22), Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)
- L-NMMA (N^G-Monomethyl-L-arginin), Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)
- NS-398, Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)

- Phosphin 3R, ICN Flow Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
- Indomethacin, Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)

3.1.4 Kommerzielle Assay Systeme

- Prostaglandine E₂ EIA Kit-Monoclonal, Cayman Chemical (Michigan, U.S.A.)
- 6-keto Prostaglandin F_{1α} EIA Kit, Cayman Chemical (Michigan, U.S.A.)
- human VEGF Immunoassay, R&D Systems (Minneapolis, U.S.A.)
- mouse VEGF Immunoassay, R&D Systems (Minneapolis, U.S.A.)

3.1.5 Instrumente und Geräte

- Biofuge A, Heraeus (Hanau, Deutschland)
- CO₂-Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Cytospin: Kleincentrifuge zum direkten Sedimentieren von Zellen auf Objektträgern: Eigenbau. Filter dazu von Shandon (Ohio, U.S.A.)
- Endohm^R, tissue resistance measurement chamber, World Precisions Instruments Inc. (Berlin, Deutschland)
- Hamilton Präzisionsspritze 100µl und 50µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
- Hettich Rotanda RP Kühlenzentrifuge mit Schwingbecherrotor (Tuttligen, Deutschland)
- MACS Säule, Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- Nylongaze, Maschenweite 100µm, 50µm, 20µm, Frank Eckert GmbH (Waldkirch, Deutschland)
- Petrischalen, bakteriologisch 100 x 15 mm, aus Polysterol, Falcon (Le Pont de Claix, Frankreich)
- pH-Meter, Mettler (Essex, England)
- Pipetten für Zellkultur: Becton & Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
- Pipettus, elektrische Pipettierhilfe, Laboserv GmbH (Gießen, Deutschland)
- Polypropylenbecher und Erlenmeyerkolben: 250 ml von Brand KG (Berlin, Deutschland)

- Präparierbesteck und Scheren zur Gewebezerkleinerung, Aeskulap GmbH (Aachen, Deutschland)
- Präparierbrett: Grösse 20 x 20 cm
- Olympus-Mikroskop, Inverted Research Microscope (IMT-2), Olympus Optical Co. GmbH (Hamburg, Deutschland)
- Säure-Base-Messgerät, ABL 330, Acid Base Laboratory, Radiometer GmbH (Frankfurt, Deutschland)
- Spritzen: 1 ml, 10 ml, 20 ml, Terumo Plastics (Tokio, Japan)
- Sterilbank (laminar air flow) Typ BSB, 4a, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Trachealtuben aus V2A-Stahl, Ø 2 mm, MSZ, Uniklinikum Giessen
- Wägezelle, Hottinger Baldwin Messtechnik (Langen, Deutschland)
- Wasserbad, Memmert GmbH (Schwalbach, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanda, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

3.1.6 Versuchstiere und Tierhaltung

Spezifisch pathogenfreie männliche Ratten der Art *Rattus norvegicus familiaris* und Zuchtlinie Spague-Dawley (CD18) mit einem Gewicht von 180-200 g (Begrenzung des Gewichts wegen höherer Zellausbeute bei jugendlichen Ratten) lieferte die Firma Charles River WIGA (Sulzfeld/ Main). Sie wurden mit Futter ad libitum versorgt und innerhalb von 48 Stunden nach Lieferung den Versuchen zugeführt.

3.1.7 Material von humanen Lungen

Die Lungen zur Isolation der humanen Alveolarepithel-Typ₂-Zellen (hTyp₂-Zellen) und der humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HLMEC) stammen aus der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar (Direktor Prof. Dr. Hans-Joachim Schäfers). Genehmigt von der lokalen Ethik-Kommission.

3.2 Zellbiologische Methoden

Soweit wie möglich wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen (Laminar Air Flow) mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt.

3.2.1 Isolation und Kultur von Alveolarepithel-Typ₂-Zellen aus Rattenlungen (rTyp₂-Zellen) nach Dobbs, Gonzales und Williams

Vor Beginn der Zellisolierung wurden die Lösungen 1 und 2 sowie physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) im Wasserbad auf eine Temperatur von 39°C erwärmt.

Immunglobulin G wurde in einer Konzentration von 500 µg/ml in 15 ml Trispuffer (50mM) gelöst, steril filtriert und gleichmäßig auf drei bakteriologische 100 mm Petrischalen verteilt.

Nach Benetzung des gesamten Bodens wurden die Platten drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die IgG-Lösung abgesaugt und die Platten fünfmal mit PBS sowie einmal mit DMEM gespült.

Für die Betäubung der Ratten wurden 0,35 ml Nembutal, 0,5 ml Ringerlösung und 0,05 ml Heparinlösung in einer Insulinspritze (1 ml) aufgezogen. Eine männliche Sprague-Dawley-Ratte (180-200 g) wurde durch intraperitoneale Injektion von 0,7-0,9 ml dieses Nembutal-Heparin-Gemisches betäubt. Die Wirkung setzte nach 2-5 Minuten ein. Begonnen wurde mit der Präparation, wenn weder ein Schmerzreiz noch ein Cornealreiz auslösbar war.

Für die Präparation wurde das Tier rücklings auf einem Brett fixiert. Nach Aufschneiden des Fells median vom Bauch bis zur Schnauzenspitze wurde der Bauchraum eröffnet, die Nierenarterien inzidiert und das austretende Blut mit Tupfern aufgenommen.

Anschließend wurde am Hals die Trachea freipräpariert, mit einer Pinzette umfahren, ein Faden unterlegt und die Trachea so weit eingeschnitten, dass ein 2 mm-Tubus (mit Luer-Adapter) eingebunden werden konnte.

Danach wurde der Thorax längs mit einer Schere durchtrennt, das Thymusgewebe entfernt und das Perikard eröffnet. Das rechte Herz und das Herzohr (linker Vorhof) wurden eingeschnitten. Eine auf das Infusionsbesteck adaptierte Pipettenspitze wurde in die Arteria pulmonalis vorgeschoben und die Lunge mit 50 ml warmer Lösung 2 perfundiert, bis das Lungenparenchym makroskopisch weiß und blutleer wurde. Vor Perfusion der Lunge wurde diese mit einer dem Trachealtubus aufgesetzten Spritze zweimal mit je 4 ml Raumluft beatmet. Anschließend wurde die Lunge zügig und möglichst schonend aus dem Thorax

herauspräpariert und von außen, zur Verringerung von Verunreinigungen, mit Lösung 2 abgespült.

Zum Entfernen der Alveolarmakrophagen wurde die Lunge achtmal mit je 6 ml Lösung 1 unter Verwendung einer 10 ml Spritze lavagiert. Dann wurde zweimal mit je 6 ml Lösung 2 sowie einmal mit 6 ml einer Elastase/Trypsin-Lösung (9 mg Elastase EC 134 und 2 mg Trypsin in 40 ml Lösung 2, entsprechend 30 U/ml Orcein-Elastin) lavagiert. Nach Instillation eines Volumens von 8 ml Elastaselösung wurde die Lunge in eine auf 37°C erwärmte Kochsalzlösung gehängt und die restliche Elastaselösung unter einem hydrostatischen Druck von 7 cm H₂O über einen Zeitraum von 20 Minuten instilliert.

Nach darauffolgender Entfernung der großen Bronchien und des verbliebenen Nicht-Lungen-Gewebes wurde die Lunge in 4 ml DNase Lösung (2,5 mg/ml) mit drei parallel geführten Scheren in einem spitzkonischen Kunststoffbecher in Stücke von etwa 1 mm³ zerkleinert.

Diese Suspension wurde mit 20 ml Lösung 2 aufgefüllt und 2 Minuten in einem Plastik-Erlenmeyerkolben im Wasserbad bei 37°C geschwenkt. Zur Unterbrechung der enzymatischen Gewebeauflösung wurde zu der Suspension 10 ml steril filtriertes FCS zugegeben und weitere 2 Minuten geschwenkt. Dieses Gemisch aus freien Zellen und Lungenstücken wurden nun durch mehrere Lagen Mull und Nylongaze der Porengrößen 100 µm, 50µm und 20 µm filtriert und aufgetrennt. Das gewonnene Filtrat aus freien Zellen wurde mit Lösung 2 in einem Falcon-Röhrchen auf ein Gesamtvolumen von 50 ml eingestellt und anschließend bei 160 G 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert.

Die sedimentierten Zellen wurden in DMEM (mit 10µg/ml DNase I-Zusatz) resuspendiert und nach Auszählung auf eine Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Zur Entfernung der Alveolarmakrophagen und Granulozyten wurden dann je 10 ml der Zelllösung auf die vorbereiteten, mit IgG beschichteten Petrischalen gegeben und bei 37°C in 10% CO₂ für 1,5 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die 10 ml Suspension mit einer wiederholt aufgenommen und abgegeben, um die nicht adhärenen Zellen zu resuspendieren. Typ₂-Zellen befanden sich nun im Überstand, Granulozyten und Makrophagen hafteten an der IgG-Plastik-Matrix (Kontrolle lichtmikroskopisch).

Nach Zentrifugation des Überstandes für 10 Minuten mit 130 G wurde dieser dekantiert und die Zellen mit DMEM mit 10% FCS auf eine Zellkonzentration von $6,67 \times 10^6$ Zellen/ml aufgefüllt.

Die auf die beschriebene Weise isolierten Zellen wurden dann in den unten aufgeführten Versuchen verwendet.

Routinemäßig wurden für eine Zellisolierung die Lungen von drei Ratten entnommen und parallel nach diesem Protokoll aufgearbeitet.

3.2.2 Isolation und Kultur von Alveolarepithel-Typ₂-Zellen aus humanen Lungen (hTyp₂-Zellen)

Zur Isolierung der humanen Typ₂-Zellen wurde zunächst das erhaltene Lungengewebe in Stücke zerkleinert und dann in 80 ml P II, Dispase II (200 mg) und 2 ml Penicillin/Streptomycin für ca. 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die digestierte Gewebemasse wurde darauf noch einmal mittels Scheren zerkleinert und dann sequenziell über Nylongaze mit 100 µm-, 50 µm- und 20µm-Porengröße filtriert. Das Nylongaze wurde mit P II gespült und das gewonnene Filtrat zentrifugiert (1500 rpm; 5 Minuten). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 50 ml PII und 1ml DNAse I (2 mg/ml) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann auf einem Ficoll-Dichtegradienten (2500rpm; 15 Minuten) zentrifugiert. Die abgenommene Interphase wurde in mehreren Waschschritten gereinigt, bis der Überstand klar wurde.

Zur Entfernung der Alveolarmakrophagen und Granulozyten wurde die Zellsuspension dann auf Gewebekulturschalen gegeben und bei 37°C in 10% CO₂ für 15 min inkubiert (Panning). Anschließend wurde die Suspension mit einer 10 ml Pipette wiederholt aufgenommen und abgegeben, um die nicht adhärenen Zellen zu resuspendieren. Typ₂-Zellen befanden sich nun im Überstand, Granulozyten und Makrophagen hafteten an den Gewebekulturschalen (Kontrolle lichtmikroskopisch). Der Überstand mit den Typ₂-Zellen wurde in 2 weiteren Panning-Schritten (15 min und anschließend 30 min) zunehmend von kontaminierenden Zellen befreit. Der letzte Aufreinigungsschritt wurde mit Hilfe von magnetischen Beats durchgeführt: die Zellen wurden ausgezählt und 3×10^7 Zellen mit 60 µl anti-CD14, 60 µl anti-CD3 magnetischen Beats und 180 µl MACS-Puffer für 20 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Die Zell-Beat-Suspension wurde auf eine MACS-Säule gegeben und so die magnetisch markierten Leukozyten von den Typ₂-Zellen getrennt.

Die so gewonnene Zellpopulation enthielt ca. 90% Epithelzellen sowie ca. 8% Alveolarmakrophagen und ca. 2% Leukozyten

3.2.3 Identifizierung isolierter Alveolarepithel-Typ₂-Zellen

Eine Methode zur Identifizierung der Typ₂-Zellen ist die Inkubation mit dem Lipid-Farbstoff Phosphin 3R. Hierzu werden einige Milliliter der verdünnten Zellsuspension mit 10µl/ml einer Stammlösung des Farbstoffes in Aceton (10 µg/ml) versetzt und nach 2 Minuten in einer Cytospin-Zentrifuge direkt auf einen Objektträger sedimentiert.

Nach Eindecken mit PBS konnten die Typ₂-Zellen im Fluoreszenzmikroskop unter Blaulicht-Erregung durch das goldgelbe Aufleuchten der für sie charakteristischen Lamellarkörper identifiziert werden. Phagozytierte Lipide und Vesikel in Makrophagen erschienen in einem gelbgrünen Farbton. Andere Zellen färbten sich nur schwach und diffus.

Zum Vergleich wurden die Ausstriche von Zellpräparationen der modifizierten Papanicolaoufärbung (KIKKAWA und YONEDA, 1974) unterworfen. Die Phospholipide werden dabei sauer oxydiert und bilden im alkalischen Milieu einen blau-schwarzen Farbkomplex mit Hämatin:

Durchführung:

1. Zellsuspension im Cytospin auf Objektträger sedimentieren und 1 Stunde trocknen
2. 2,5 Minuten in Harris Haematoxylin inkubieren
3. zwei Mal in Aqua dest. tauchen, um Farblösung abzuspielen
4. 2 Minuten in 0,03% iger LiCO₃-Lösung inkubieren
5. einmal in Aqua dest. abspülen
6. Objektträger durch aufsteigende Alkohldreihe führen
7. Kurz in Xylol tauchen und Eindecken mit Entellan

3.2.4 Vitalitätstests

Die Vitalitätsbestimmung der Typ₂-Zellen stützte sich auf die Beobachtung, dass die Oberflächenmembranen lebender Zellen die Fähigkeit besitzen, bestimmte Substanzen auszuschließen, während avitale Zellen diese durch die Zellmembran hindurch treten lassen. Eine solche Substanz ist das Erythrosin B(2,5 mg/100ml PBS). Dieses wurde den Zellen im Verhältnis 1:100 zugemischt und 5 Minuten lang inkubiert. Darauf wurden die Zellen sedimentiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Grünlichtanregung betrachtet. Die Zahl der leuchtenden und damit avitalen Zellen wurde in Relation mit den vitalen, nicht leuchtenden Zellen gesetzt.

3.2.5 Isolation und Kultur von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HLMEC)

Die humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. Robert Voswinckel, Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, isoliert.

Mir wurden diese Zellen dann freundlicherweise in der 2.-4. Passage übergeben.

Die Zellen wurden in den Versuchen in den Passagen 3-7 eingesetzt

Kultur der HLMEC:

Für die Kultivierung der HLMEC wurde das Kulturmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 75cm² bei 37 °C inkubiert, bis sie sich abzulösen begannen. Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und nach Zugabe von 5ml Wachstumsmedium durch die darin enthaltenen Trypsininhibitoren gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Röhrchen (Falcon) überführt und für 5min bei 1200rpm (Zentrifuge 4K10) und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in frischem Medium resuspendiert und in einer der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen entsprechenden Verdünnung in neuen Gewebekulturschalen ausgesät (Passagieren).

3.2.6 Identifizierung der Endothelzellen

Die Identifizierung und die Kontrolle der Reinheit in den Passagen erfolgte nach morphologischen und immunhistochemischen Kriterien. Hierbei galt es vor allem, die Endothelzellen von Fibroblasten zu unterscheiden. Während Endothelzellen unter dem Mikroskop einschichtig in Form eines kopfsteinpflasterartigen Reliefs mit zentralliegenden Zellkernen wachsen, erkennt man Fibroblasten an ihrem spindelförmigen Aussehen, ihren langen dünnen Zellfortsätzen und dem mehrschichtigen Wachstum.

Immunhistologisch wurde die Identifizierung der Endothelzellen durch den Nachweis des CD31 auf der Zelloberfläche durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Zellen zweimal mit PBS⁺ gewaschen und dann für 5 Minuten mit Aceton/Methanol (1:1; -20°C) fixiert. Nach erneutem Waschen wurde mit 10µg eines primären Antikörpers gegen CD 31 für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch zweimaliges Waschen wurden die nicht gebundenen Antikörper entfernt und dann 10 µg eines mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten sekundären Antikörpers gegen Maus IgG für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch Waschen entfernt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließen sich die Endothelzellen nun durch ihre grün fluoreszierende Farbe leicht identifizieren.

3.2.7 Ko-Kultivation von Typ₂-Zellen und HLMEC

Bei den Ko-Kultur-Versuchen wurden zwei verschiedene Modelle benutzt. Beim ersten Ansatz waren die beiden Zelltypen nur durch die Membran des Transwelleinsatzes getrennt, beim zweiten bestand nur über das Kulturmedium ein Kontakt zwischen den Zellen.

Ko-Kultur-Modell mit Zellkontakt:

12 Stunden vor Beginn der Isolation der Typ₂-Zellen aus den Lungen wurde zunächst der Einsatz von Transwells unter sterilen Bedingungen herausgenommen, um 180° gedreht und der Einsatz auf den Boden der Transwells gestellt. Anschließend wurde ein passender Silikonring auf den gedrehten Einsatz gesetzt.

Nun wurde die Membran mit 20 µl Fibronectin beschichtet und bei 37°C für 45 Minuten inkubiert.

Dann wurden auf jeden Einsatz 60000 Endothelzellen gegeben, mit HLMEC-Medium umspült und für 18 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bis sie einen geschlossenen Zellrasen bildeten.

Nach Isolation der Typ₂-Zellen wurde der Silikonring entfernt, der Einsatz wieder in die Halterung eingepasst und anschließend 2 Millionen Epithelzellen in den Einsatz der Transwells gegeben.

Ko-Kultur-Modell ohne Zellkontakt:

12 Stunden vor Beginn der Isolation der Typ₂-Zellen aus den Lungen wurde zunächst der Boden der Transwells mit 20 µl Fibronectin beschichtet und bei 37°C für 45 Minuten inkubiert.

Dann wurden dort 60000 Endothelzellen zugegeben, mit HLMEC-Medium umspült und für 18 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Nach Isolation der Typ₂-Zellen wurden 2 Millionen Typ₂-Zellen in den Einsatz des Transwells gegeben.

	Medium	Inkubation CO₂ (in %)
rTyp ₂ -Zelle	DMEM + 10% FCS + 2% Glutamin + 0,1% Gentamycin	10
hTyp ₂ -Zelle	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% Glutamin + 1% Penicillin + 1% HEPES	5
HLMEC	MCDB 131 + 5% FCS + 5% HS + 25 Glutamin + 1% Heparin + 0,1% Gentamycin	5
Ko-Kultur rTyp ₂ -Zelle/HLMEC	DMEM + 10% FCS + 2% Glutamin + 0,1% Gentamycin	10
Ko-Kultur hTyp ₂ -Zelle/HLMEC	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% Glutamin + 1% Penicillin + 1% HEPES	5

Abbildung 10: Bei verschiedenen Zelllinien verwendete Medien

Für die Ko-Kultur-Versuche wurde ein an beiden Zelltypen adaptiertes Medium (siehe Abbildung 10) eingesetzt und die Kulturen bei 37°C im Inkubator mit Zusatz von 10% CO₂ (rTyp₂-Zellen) bzw. 5% CO₂ (hTyp₂-Zellen) equilibriert.

Die Zellkulturen wurden dann den Versuchen zugeführt.

3.2.8 Kontrolle des Ko-Kultur-Systems

Zur Kontrolle, ob die beiden Zelltypen nach 48 Stunden Inkubation noch auf den beiden Seiten der Transwellmembran wachsen, wurden sie nach den Versuchen lichtmikroskopisch kontrolliert. Desweiteren wurden Immunfluoreszenz-Färbungen des Ko-Kultur-Systems (in diesem Fall jedoch, aufgrund der besseren Verfügbarkeit, mit HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)) durchgeführt.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass das Ko-Kultur-System funktioniert und sich Typ₂-Zellen und HLMEC auf den zwei Seiten einer Transwellmembran in einem gemeinsamen Kulturmedium kultivieren lassen.

3.2.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz der Ko-Kultur

Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Filter gewaschen und anschließend apikal (auf dem Filter) und basal (im unteren Well) mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:2) für 5 Minuten fixiert. Nach dreimaligem, gründlichem Waschen erfolgte das Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation mit 3% BSA in PBS (-/-) für 20 Minuten zunächst apikal, und dann nach Umdrehen des Filters auch basal. Es folgte ein weiterer Waschschriff und die Inkubation mit den primären Antikörpern bzw. biotinyliertem Lektin erst apikal und - nach Umdrehen des Filters – basal für je 60 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt, bevor der sekundäre Fluorochrom-gelabelte Antikörper bzw. das Fluorochrom-gelabelte Avidin apikal und anschließend basal aufgebracht wurde. Dies wurde dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch einen letzten Waschschriff (3x) wurden die nicht gebundenen sekundären Antikörper entfernt (Abbildung 11). Die Filter werden nun ausgeschnitten und mit Fluorescence Mounting Media (Dako) auf einem Objektträger fixiert und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Die Beurteilung erfolgte mit einem Leica-Mikroskop (DMLA, Kamera: DC 300 FX) (Abbildung 12a-c)

Abbildung 11: Eingesetzte Antikörper

	Typ ₂ -Zellen	HUVEC
Primäre Antikörper	-mouse-anti-mammals Cytokeratin 18, clone RGE 53 (CK18) -Macula pomifera-Lektin (MPA)	-Mouse-anti human von Willebrand Faktor (vWF)
Sekundäre Antikörper	-goat-anti-mouse IgG-FITC -Avidin-Texas Red	

Abbildung 12a: Ko-Kultur Typ₂-Zellen (CK18)

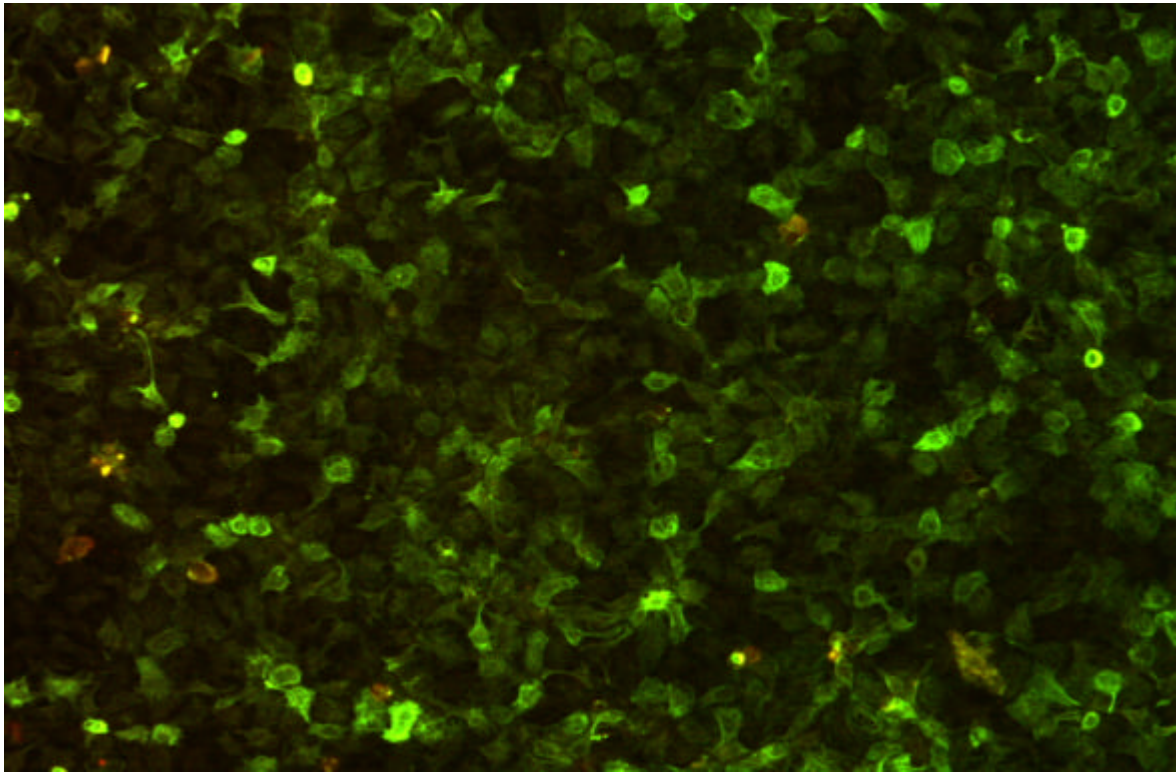


Abbildung 12b: Ko-Kultur Typ₂-Zellen (MPA)

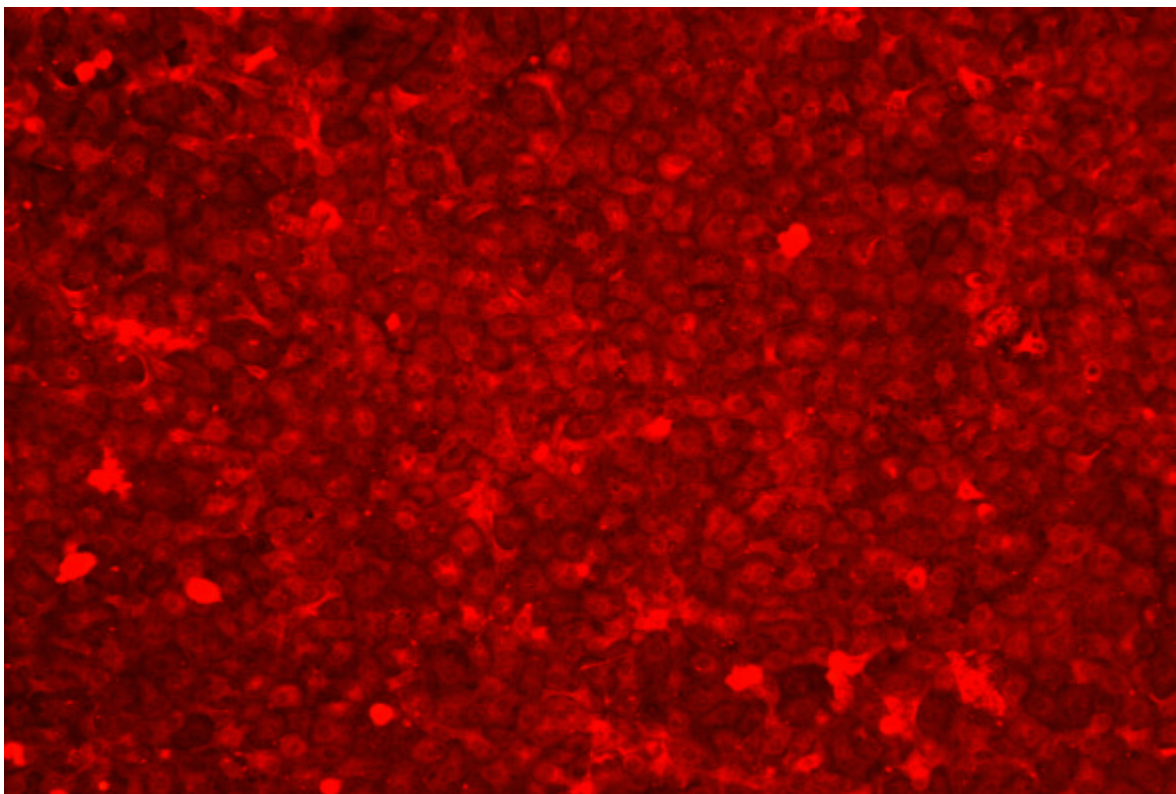
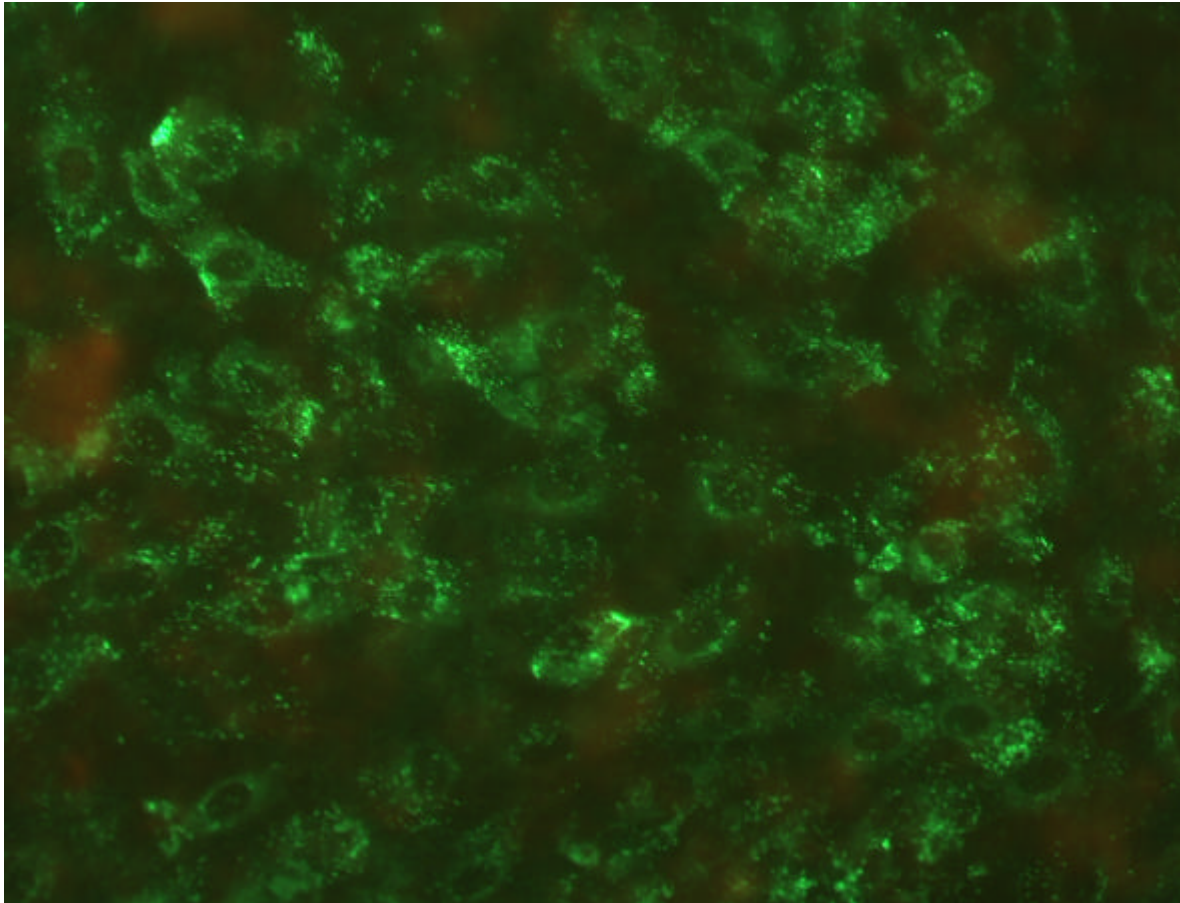


Abbildung 12c:*Abbildung 12 a-c:*

- a) Dargestellt sind Typ₂-Zellen nach 48 Stunden Ko-Kultivation mit HUVEC. Die Typ₂-Zellen befanden sich apikal auf den Transwells und wurden von apikal mit Zytokeratin 18 markiert (Vergrößerung 10x).*
- b) Dargestellt sind Typ₂-Zellen nach 48 Stunden Ko-Kultivation mit HUVEC. Die Typ₂-Zellen befanden sich apikal auf den Transwells und wurden von apikal mit Macula pomifera-lektin (MPA) markiert (Vergrößerung 10x).*
- c) Dargestellt sind HUVEC nach 48 Stunden Ko-Kultivation mit Typ₂-Zellen. Die HUVEC befanden sich basal auf den Transwells und wurden von basal mit von Willebrand Faktor markiert (Vergrößerung 40x) .*

3.3 Proteinbiochemie

Die Messung von PGE_2 , 6-keto Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ und VEGF erfolgte über kommerzielle Assay-Systeme. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen und zellfrei bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die verwendeten ELISA's funktionierten sämtlich nach dem Prinzip des „Sandwich-ELISA's“.

3.3.1 ELISA zur Detektion von PGE_2

Es wurden die Antikörperpaare der Firma Cayman verwendet, die für die Durchführung eines "Sandwich-ELISA's" gegen PGE_2 empfohlen wurden.

3.3.1.1 Lösungen, Antikörper und Materialien

- Goat anti-mouse IgG Coated Wells, 96 wells per plate
- Plate Covers, adhesive stripes
- Wash Buffer Konzentrate, (5 ml gelöst in 2 Liter UltraPure Water)
- EIA Buffer Konzentrate, (10 ml gelöst in 90 ml UltraPure Water)
- Prostaglandin E_2 Monoclonal Antibody, (100 dtn per vial, gelöst in 6 ml EIA-Buffer)
- Prostaglandin E_2 AchE Tracer, (100 dtn per vial, gelöst in 6 ml EIA-Buffer)
- Prostaglandin E_2 EIA standart
- Ellman's Reagenz, (100 dtn per vial, gelöst in 20ml UltraPure Water)

In die Vertiefungen der mit polyklonalen anti-mouse-IgG beschichteten ELISA-Platte wurden je $50\mu\text{l}$ der Zellkulturüberstände (Verdünnung 1:5 bis 1:20) und einer Verdünnungsreihe des PGE_2 -Standards (Konzentration 1000 pg/ml bis 7,8 pg/ml) in Duplikaten pipettiert.

Nach Zugabe von $50\mu\text{l}$ Prostaglandin E_2 AchE Tracer und $50\mu\text{l}$ des monoklonalen Prostaglandin E_2 Antikörpers wurde die Platte mit einem Plastikfilm verschlossen und für 18 Stunden bei 4°C inkubiert.

Anschließend folgten fünf Waschschrte und die Zugabe von je $200\mu\text{l}$ Ellman's Reagenz in die Vertiefungen. Nach 60-90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die

Extinktion bei 405nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand der Eichreihe konnte die PGE₂-Konzentration errechnet werden.

3.3.2 ELISA zur Detektion von 6-keto Prostaglandin F_{1α}:

3.3.2.1 Lösungen, Antikörper und Materialien

- Mouse anti-rabbit IgG Coated Wells, 96 wells per plate
- Plate Covers, adhesive stripes
- Wash Buffer Konzentrate, (5 ml gelöst in 2 Liter UltraPure Water)
- EIA Buffer Konzentrate, (10 ml gelöst in 90 ml UltraPure Water)
- 6-keto Prostaglandin F_{1α} EIA Antiserum, (100 dtn per vial, gelöst in 6 ml EIA-Buffer)
- 6-keto Prostaglandin F_{1α} AchE Tracer, (100 dtn per vial, gelöst in 6 ml EIA-Buffer)
- 6-keto Prostaglandin F_{1α} EIA Standart
- Ellman's Reaganz, (100 dtn per vial, gelöst in 20ml UltraPure Water)

In die Vertiefungen der mit Mouse-anti-rabbit-IgG beschichteten ELISA-Platte wurden je 50µl der Zellkulturüberstände (Verdünnung 1:5 bis 1:20) und einer Verdünnungsreihe des PGE₂-Standards (Konzentration 500 pg/ml bis 7,8 pg/ml) in Duplikaten pipettiert.

Nach Zugabe von 50 µl des 6-keto Prostaglandin F_{1α} -AchE-Tracer und 50 µl des 6-keto Prostaglandin F_{1α} -EIA-Antiserums wurde die Platte mit einem Plastikfilm verschlossen und für 18 Stunden bei 4°C inkubiert.

Anschließend folgten fünf Waschschrte und die Zugabe von je 200µl Ellman's Reaganz in die Vertiefungen. Nach 90 bis 120-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 405nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand der Eichreihe konnte die 6-keto Prostaglandin F_{1α} -Konzentration errechnet werden.

3.3.3 ELISA zur Detektion von VEGF

Wie die ELISA's zur Messung von PGE₂ und PGI₂ sind die zur Detektion von VEGF genutzten ELISA's sogenannte „Sandwich-ELISA's“. Es wurden die kommerziellen Systeme der Firma R&D Systems für humanes VEGF und murines VEGF verwendet und nach der vom Hersteller beigelegten Anleitung benutzt. Zur Zeit der Durchführung dieser Arbeit war noch kein System zur Detektion von VEGF der Ratte auf dem Markt. Die Firma R&D Systems versicherte jedoch, dass der ELISA zur Detektion von murinen VEGF auch zur

Bestimmung von VEGF der Ratte geeignet ist, da die Aminosäuresequenzen dieser beiden VEGF-Arten eine 100 % ige Homologie aufweisen (Kundenservice R&D Systems GmbH, Borsigstr.7, 65205 Wiesbaden, Deutschland. Telefon: 0049/6122/90980).

3.4 Widerstandsmessung der Zelllayer

Die Messung des elektrischen Widerstandes des Zelllayers erfolgt mit Hilfe eines Endohms (tissue resistance measurement) der Firma World Precision Instruments, Inc., (U.S.A.). Nach dem Ohmschen Gesetz errechnet sich ein Widerstand (R) dem ein Leiter dem Strom entgegenhält aus dem Quotient der Spannung (U) und der Stromstärke (I). $R=U/I$, gemessen in Ohm.

Wenn konfluierende Zellen sich zu einem Zelllayer zusammenfinden kann, aufgrund eines durchgängigen Stroms ein Widerstand an diesem Layer gemessen werden, der dessen epithelialen Charakter dokumentiert.

Im Gegensatz wäre ein verminderter Widerstand in jenen Wells zu erwarten, in denen es nicht zur Ausbildung eines epithelialen und damit zusammen hängenden Zellverbandes kommt.

3.5 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit ungepaartem T-Test auf Ihre Signifikanz überprüft. Es wurden ungleiche Varianzen vorausgesetzt. Angaben sind jeweils Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $P < 0,05$ festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

4. Ergebnisse

4.1 Übersicht

In den vorliegenden Untersuchungen wurde zunächst ein *in vitro* Modell der alveolo-kapillären Membran in der Alveole etabliert.

Im Anschluss daran sollten Unterschiede zwischen mono-kultivierten Typ₂-Zellen und dem Ko-Kultur Modell hinsichtlich der Parameter PGE₂, PGI₂ und VEGF sowie der Entwicklung des elektrischen Widerstandes herausgearbeitet werden.

Die erste Fragestellung lautete, ob die Kultivierung von Typ₂-Zellen mit HLMEC zu einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der vorgenannten Substanzen führt. Falls Unterschiede festzustellen sind, sollte versucht werden, die hierfür verantwortlichen Mechanismen zu klären. Desweiteren war zu überprüfen, ob sich die beiden Systeme hinsichtlich ihrer Widerstandsentwicklung unterscheiden.

Nach den im Methodenteil dargestellten Verfahren wurden die Zellen isoliert und für die Versuche ausgesät. Nach Aufbringen der Zellen auf die Membranen wurden sie den einzelnen Versuchen zugeführt und für 48 Stunden inkubiert. Der genaue Ablauf der Versuche ist in den jeweiligen Kapiteln näher erläutert.

Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von humanen Gewebematerial konnten nur wenige Experimente mit humanen Typ₂-Zellen ausgeführt werden. In den meisten Fällen wurde auf Typ₂-Zellen der Ratte zurückgegriffen.

4.2 Freisetzung von PGE₂ in mono-kultivierten Typ₂-Zellen der Ratte sowie des Menschen im Vergleich zur Ko-Kultivation von Typ₂-Zellen mit HLMEC

PGE₂ spielt als Metabolit der Arachidonsäure in der Lunge eine wichtige Rolle als anti-inflammatorischer Mediator. Es fördert in der Lunge die Surfactantsekretion, führt zu einer Bronchialdilatation, hemmt die Proliferation von Lymphozyten, stabilisiert die endotheliale Barriere, fördert die Epithelregeneration und ist in der Lage Fibroblasten zu hemmen.

PGE₂ wurde mittels eines ELISA's aus den Zellkulturüberständen, wie in 2.2.1 beschrieben, bestimmt.

4.2.1 Induktion des Prostaglandins PGE₂ während der Ko-Kultur von Typ₂-Zellen der Ratte mit HLMEC

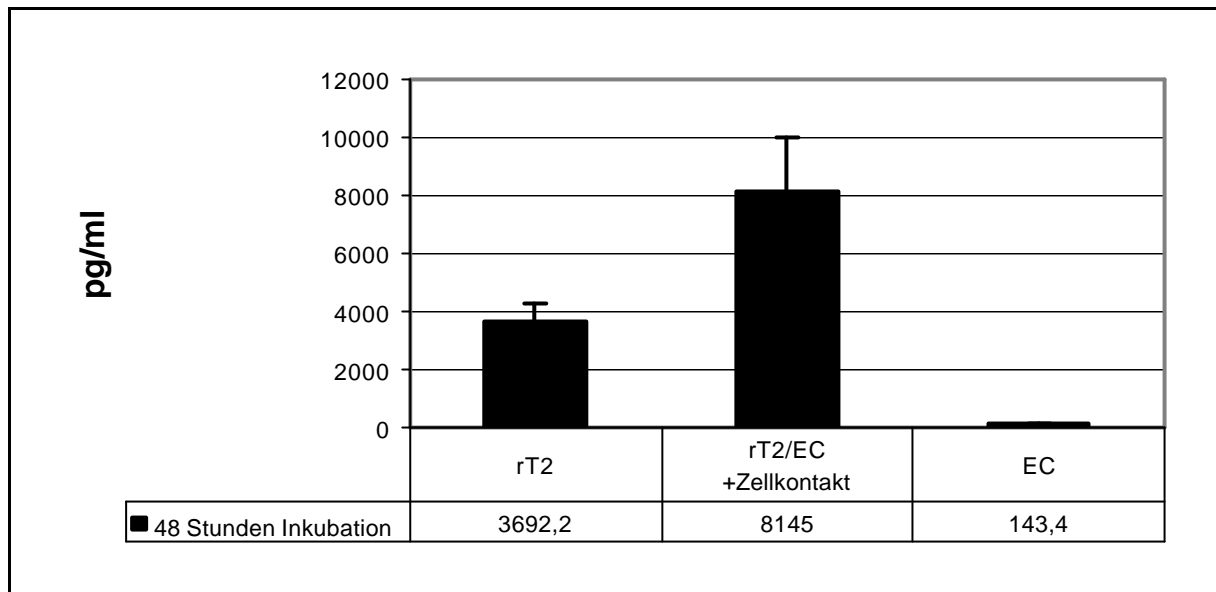
In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob sich ein Unterschied in der PGE₂-Sekretion zwischen Typ₂-Zellen der Ratte (rTyp₂-Zellen) und der Ko-Kultivierung von Typ₂-Zellen der Ratte mit HLMEC nachweisen lässt.

Bei den Ko-Kultur Versuchen wurden beide Zelltypen auf die zwei Seiten eines Transwells ausgesät und damit ein unmittelbarer Kontakt zwischen den Zellen ermöglicht (wie in 3.2.7. beschrieben). Parallel dazu liefen Ansätze mit mono-kultivierten rTyp₂-Zellen und HLMEC.

Typ₂-Zellen sind in der Lage PGE₂ zu sezernieren. Die von den mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen gebildeten Mengen PGE₂ sind nur gering. Innerhalb von 48 Stunden ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Gesamtproduktion von PGE₂ zwischen den mono-kultivierten Zellen und dem Ko-Kultur System.

Monokultivierte HLMEC sezernierten $m=143,4 \pm 29$ pg/ml PGE₂ in das Kulturmedium. Die Typ₂-Zellen gaben in dem Zeitraum von 48 Stunden insgesamt $m=3692,2 \pm 588$ pg/ml an das Medium ab. Zusammen genommen produzierten die beiden Zelltypen im Mittel innerhalb von 48 Stunden $3835,6 \pm 617$ pg/ml PGE₂.

Während dieses Zeitraumes haben die Zellen im Ko-Kultur System mit Zellkontakt $m=8145$ pg/ml ± 1893 PGE₂ gebildet, also mehr als doppelt so viel wie die mono-kultivierten Zellen (Abbildung 11).

Abbildung 11: PGE₂-Sekretion rTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit Zellkontakt

PGE₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, HLMEC und kokultivierten rTyp₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt.

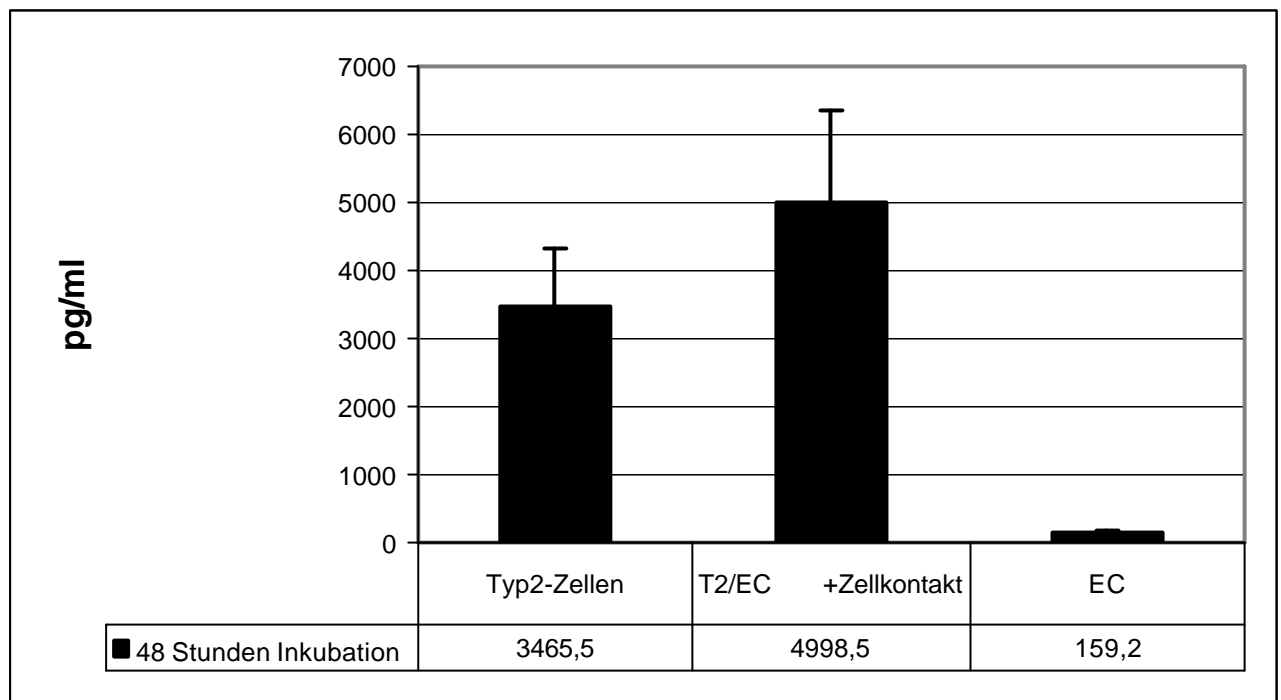
In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert. Danach sind die Überstände entnommen worden. Die PGE₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 20 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

4.2.2 Induktion des Prostaglandins PGE₂ während der Ko-Kultur von humanen Typ₂-Zellen mit HLMEC

Die Versuche mit humanen Typ₂-Zellen (hTyp₂-Zellen) wurden in gleicher Weise wie die Versuche an Rattenzellen durchgeführt.

Auch hTyp₂-Zellen sind in der Lage PGE₂ zu produzieren. Ebenso wie bei den rTyp₂-Zellen produzieren die hTyp₂-Zellen im Ko-Kultur Modell mit Zellkontakt mehr PGE₂ als die monokultivierten Zellen, die Steigerung ist jedoch nicht signifikant. Innerhalb von 48 Stunden gaben die hTyp₂-Zellen ($m = 3465,5 \pm 874$ pg/ml) und die HLMEC ($159,2 \pm 22$ pg/ml) zusammengerechnet $m = 3624,7 \pm 896$ pg/ml PGE₂ in das Medium ab. Im Vergleich dazu produzierten die Zellen im Ko-Kultur Modell im gleichen Zeitraum $m = 4998,5 \pm 1343$ pg/ml PGE₂. Dies stellt mehr als den 1,3-fachen Wert da (Abbildung 12).

Abbildung 12: PGE₂-Sekretion hTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit Zellkontakt

PGE₂-Freisetzung von hTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten hTyp₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt.

In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert. Danach sind die Überstände entnommen worden. Die PGE₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 5 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

4.3 Freisetzung von PGI₂ in mono-kultivierten Typ₂-Zellen der Ratte sowie des Menschen im Vergleich zur Ko-Kultur von Typ₂-Zellen mit HLMEC

Auch PGI₂ (Prostazyklin) spielt als ein Produkt der Arachidonsäure eine Rolle in einer Reihe physiologischer und pathologischer Vorgänge. Es beeinflusst die Regulation des Gefäßtonus, der Bronchorelaxation und somit auch des Gasaustausches in der Lunge.

Eine überschüssige, entkoppelte Freisetzung von PGI₂ kann dagegen ursächlich an einer massiven systemischen Vasodilatation und an der Entstehung eines schweren Schocks beteiligt sein.

Da PGI₂ ein sehr instabiler Mediator ist, wurde dessen Freisetzung durch sein Abbauprodukt 6-keto-Prostaglandin F_{1 α} nachgewiesen. Dieser Metabolit ist wesentlich stabiler als PGI₂ und kumuliert im Zellüberstand.

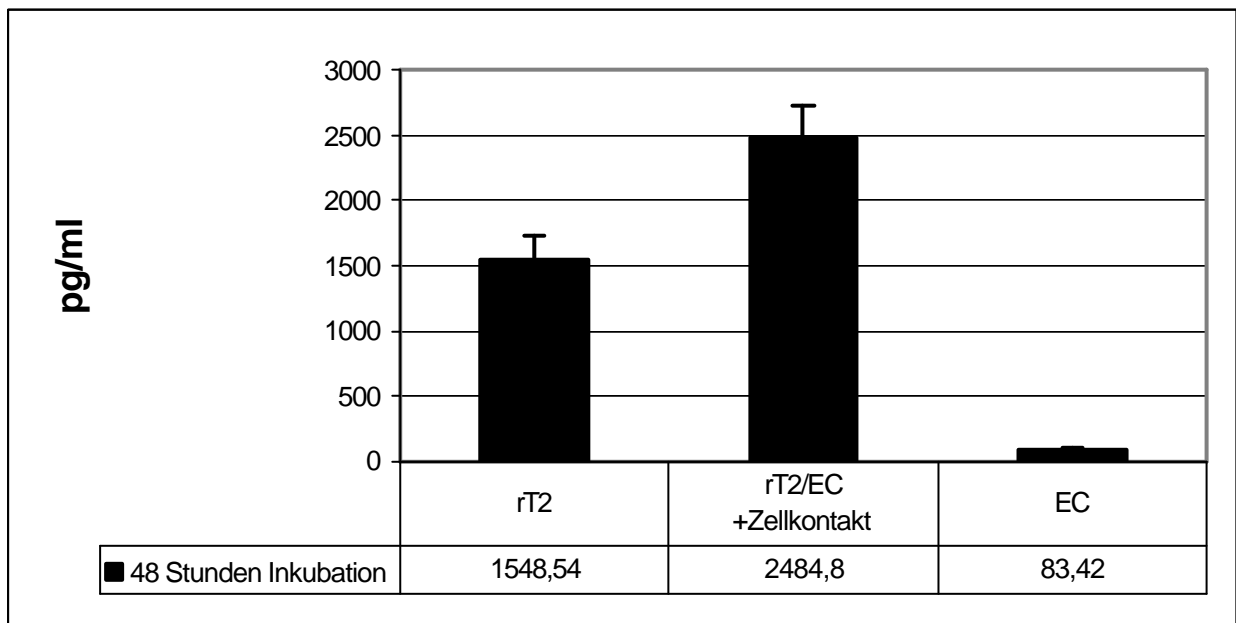
4.3.1 Induktion des Prostaglandins PGI₂ während der Ko-Kultur von Typ₂-Zellen der Ratte mit HLMEC

Neben PGE₂ sollte untersucht werden, ob auch bei der Produktion von PGI₂ Unterschiede zwischen der Ko-Kultur und den mono-kultivierten Zellen bestehen.

Die Versuche wurden in identischer Weise wie in 4.2.1. beschrieben durchgeführt.

Wie bei der Produktion von PGE₂ sind rTyp₂-Zellen und HLMEC in der Lage PGI₂ freizusetzen. Nach 48 Stunden wurde im Zellüberstand der rTyp₂-Zellen $m = 1548,54 \pm 188$ pg/ml PGI₂ und im Überstand der Endothelzellen $m = 83,42 \pm 26$ pg/ml nachgewiesen, zusammen eine Produktion von $m = 1631,96 \pm 214$ pg/ml. Vergleicht man diese Werte nun mit dem Ko-Kultur System mit Zellkontakt fällt auf, dass dort innerhalb von 48 Stunden signifikant mehr, nämlich $m = 2484,8 \pm 243$ pg/ml PGI₂ freigesetzt wurde, das 1,5-fache der Summe der mono-Kultur Werte (Abbildung 13).

Abbildung 13: PGI₂-Sekretion rTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit Zellkontakt



PGI₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt.

In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert. Danach sind die Überstände entnommen worden. Die PGI₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 5 unabhängigen Experimenten.

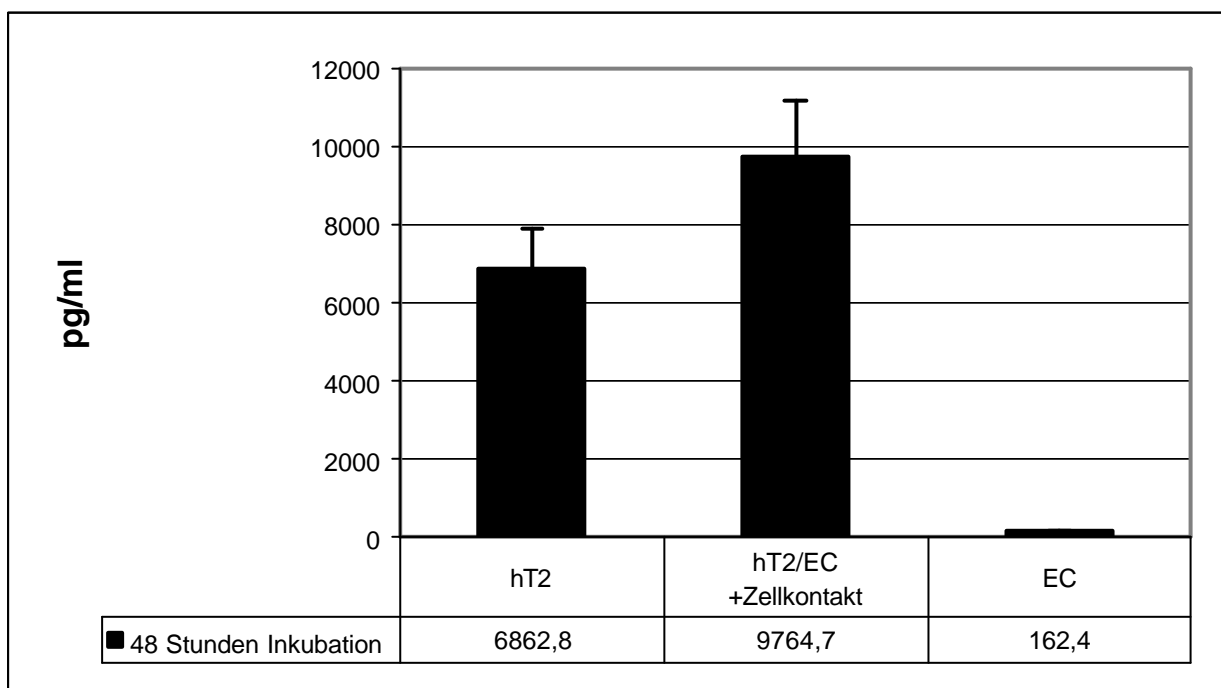
(Abk.: T2: Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

4.3.2 Induktion des Prostaglandins PGI₂ während der Ko-Kultur von humanen Typ₂-Zellen mit HLMEC

Die Versuche mit humanen Typ₂-Zellen (hTyp₂-Zellen) wurden so wie die Versuche mit Rattenzellen durchgeführt.

Auch hTyp₂-Zellen sind in der Lage PGI₂ zu produzieren. Ebenso wie bei den rTyp₂-Zellen erzeugen die hTyp₂-Zellen im Ko-Kultur Modell mit Zellkontakt signifikant mehr PGI₂ als die mono-kultivierten Zellen. Innerhalb von 48 Stunden gaben die hTyp₂-Zellen ($m = 6862,8 \pm 1019,7$ pg/ml) und die HLMEC ($m = 162,4 \pm 9,3$ pg/ml) zusammengerechnet $m = 7025,2 \pm 1029$ pg/ml PGI₂ in das Medium ab. Im Vergleich dazu produzierten die Zellen im Ko-Kultur Modell im gleichen Zeitraum $m = 9764,7 \pm 1435$ pg/ml PGI₂. Dies stellt mehr als den 1,3-fachen Wert da (Abbildung 14).

Abbildung 14: PGI₂-Sekretion hTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit Zellkontakt



PGI₂-Freisetzung von hTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten hTyp₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt.

In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGI₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

4.4 Freisetzung von VEGF in mono-kultivierten Typ₂-Zellen der Ratte sowie des Menschen im Vergleich zur Ko-Kultur von Typ₂-Zellen mit HLMEC

VEGF wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet, unter anderem auch von Typ₂-Zellen. Es spielt eine gewichtige Rolle in der Differenzierung von Endothelzellen, in der Angiogenese und der Entstehung und Regeneration von Blutgefäßen.

In der Lunge soll VEGF unter pathologischen Konditionen vor allem eine Bedeutung im Rahmen des ARDS besitzen, wo es unter anderem für die Entstehung des Lungenödems mit verantwortlich sein soll.

4.4.1 Inhibition der VEGF-Freisetzung während der Ko-Kultur von Typ₂-Zellen der Ratte mit HLMEC

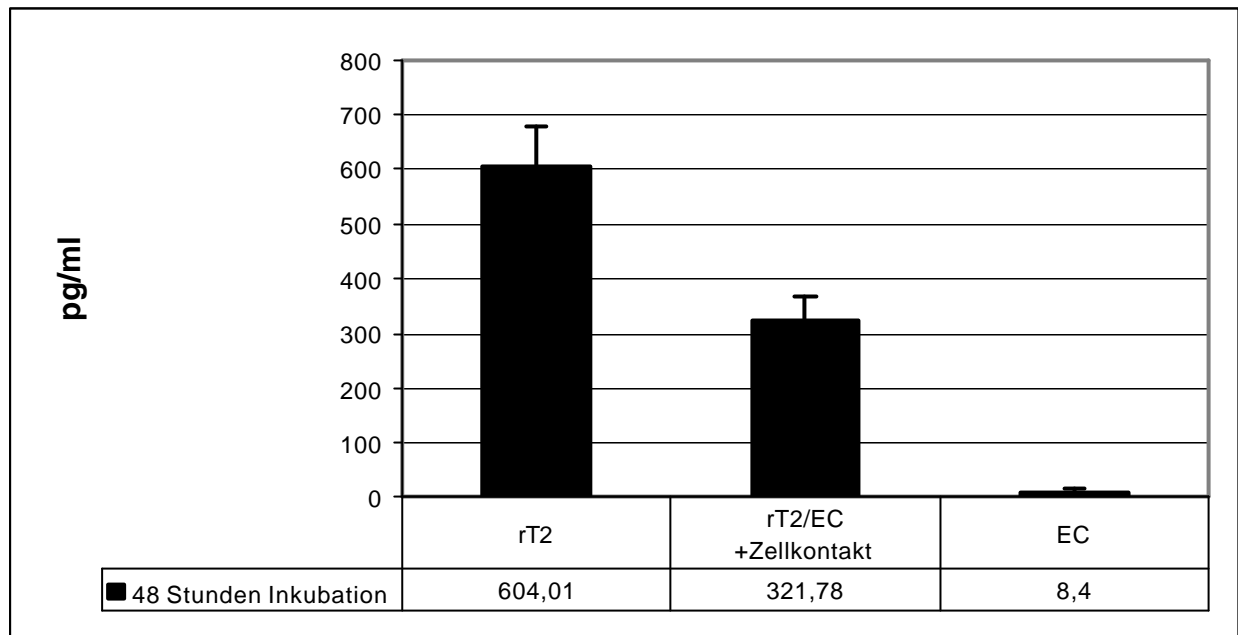
Zusätzlich zu den beiden pro-inflammatorischen Mediatoren PGI₂ und PGE₂ sollte auch noch der pro-angiogenetische Faktor VEGF in dem entwickelten Ko-Kultur Modell im Hinblick auf Unterschiede bezüglich der Menge an produziertem VEGF untersucht werden.

Diese Experimente wurden wiederum wie in 4.2.1. beschrieben durchgeführt.

VEGF wurde von Typ₂-Zellen der Ratte signifikant freigesetzt. Innerhalb von 48 Stunden wurden insgesamt $m = 604,01 \pm 75$ pg/ml VEGF in das Zellkulturmedium abgegeben. Die mikrovaskulären Endothelzellen bildeten mit $m = 8,4 \pm 5$ pg/ml keine markante Menge an VEGF.

Im Ko-Kultur Modell ließen sich hingegen nur ca. 50 % der VEGF-Menge im Vergleich zu den Typ₂-Zellen in Monokultur im Überstand nachweisen, nämlich $m = 321,78 \pm 46$ pg/ml. Dieser Unterschied stellt sich als signifikant dar.

(Abbildung 15).

Abbildung 15: VEGF-Sekretion rTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit Zellkontakt

VEGF-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten rTyp₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt.

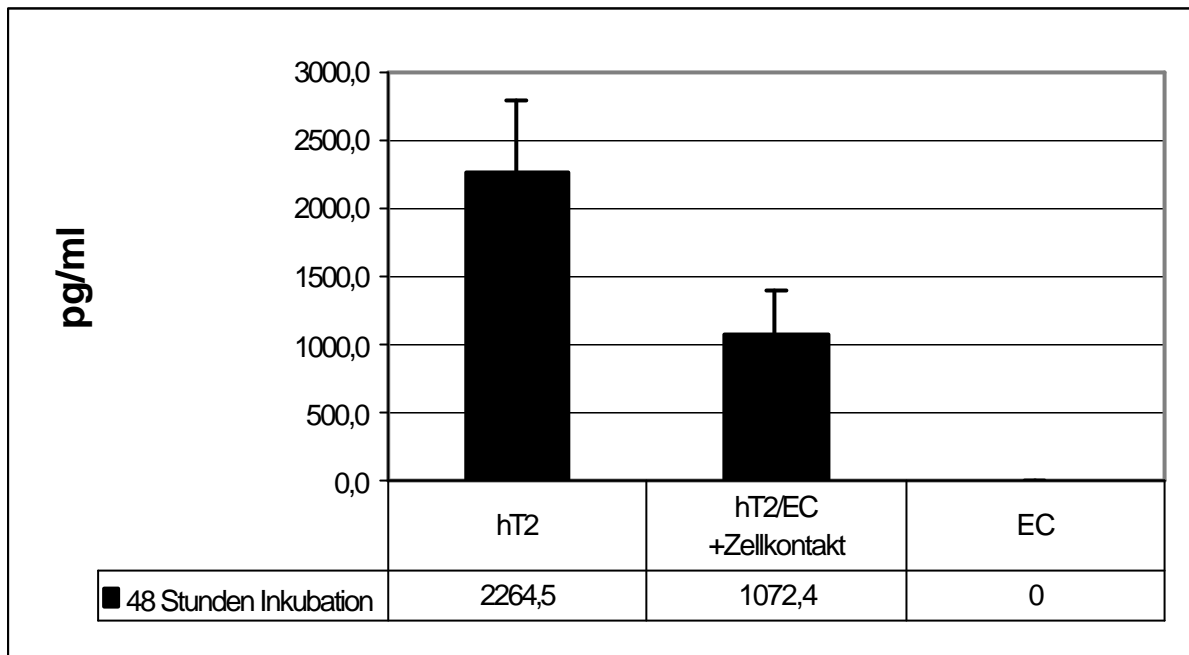
In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert. Danach sind die Überstände entnommen worden. Die VEGF-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 12 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

4.4.2 Inhibition der VEGF-Freisetzung während der Ko-Kultur von humanen Typ₂-Zellen mit HLMEC

VEGF wurde von Typ₂-Zellen des Menschen signifikant freigesetzt. Innerhalb von 48 Stunden wurden insgesamt $m = 2264,48 \pm 529$ pg/ml VEGF in das Zellkulturmedium abgegeben. Die mikrovaskulären Endothelzellen bildeten VEGF unter der Nachweisgrenze des Assays.

Im Ko-Kultur Modell ließen sich hingegen nur ca. 50 % der VEGF-Menge im Vergleich zu den Typ₂-Zellen in Monokultur im Überstand nachweisen, nämlich $m = 1072,42 \pm 319$ pg/ml. Diese Differenz ist signifikant (Abbildung 16).

Abbildung 16: VEGF-Sekretion hTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit Zellkontakt

VEGF-Freisetzung von hTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten hTyp₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt. In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert. Danach sind die Überstände entnommen worden. Die VEGF-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 5 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

4.5 Überprüfung der Cyclooxygenase-Abhängigkeit der erhöhten PGE₂-, PGI₂- Werte sowie der erniedrigten VEGF-Werte im Ko-Kultur-Modell

Bereits 1893 synthetisierte der deutsche Chemiker Felix Hoffmann die azetylierte Form der Salizylsäure, das Aspirin. Es dauerte jedoch noch fast ein Jahrhundert, bis Vane im Jahr 1971 den Wirkmechanismus, nämlich die Hemmung des Enzyms „Cyclooxygenase“, beschrieb. Nach Entdeckung einer zweiten Isoform der Cyclooxygenase wurden dann im Laufe der Zeit auch selektive Hemmer dieser Isoform entwickelt.

Anhand dieser Versuche sollte geklärt werden, ob die gesteigerte Synthese von PGE₂ und PGI₂ sowie die verminderte Freisetzung von VEGF in den Zellkulturüberständen einen Cyclooxygenase-abhängigen Prozess darstellt.

Hierfür wurde zunächst der unselektive Cox-1/2-Hemmer Indometacin und im Anschluß der selektive Cox-2-Hemmer NS-389 eingesetzt.

Nach Aufbringen der Zellen auf die Membranen wurden sie für 48 Stunden mit dem unspezifischen Cox-1/2-Hemmer Indometacin mit einer Konzentration von 10µM inkubiert. Die PGE₂- und die PGI₂-Produktion konnten von Indometacin sowohl in den mono-kultivierten Typ₂-Zellen als auch im Ko-Kultur-System auf unter 10 % des Ausgangswertes gesenkt werden. Die Experimente haben auch gezeigt, dass sich die Ergebnisse sowohl in humanen als auch in Typ₂-Zellen der Ratte reproduzieren lassen. Hinsichtlich der Synthese bzw. der Freisetzung von VEGF ergab sich weder bei den mono-kultivierten noch bei den ko-kultivierten Typ₂-Zellen ein markanter Unterschied (Ergebnisse nicht dargestellt).

Anschließend wurde der selektive Cox-2-Hemmer NS-389 eingesetzt. Die IC₅₀ wurde nach Angaben des Herstellers mit 2,0 µM angegeben, in dieser Konzentration wurde NS-389 auch in den Versuchen eingesetzt.

Wie zuvor wurden die Zellen nach Aussaat auf die Membranen für 48 Stunden inkubiert und im Anschluss der Zellkulturüberstand abgenommen.

Nach 48 Stunden Inkubation mit dem Cox-2-Hemmer NS-389 zeigte sich eine Senkung der PGE₂-und PGI₂-Sekretion sowohl in Typ₂-Zellen der Ratte als auch des Menschen auf unter 10 % des Ausgangswertes.

Bezüglich der VEGF-Freisetzung ergibt sich bei der Inkubation mit dem selektiven Cox-2-Hemmer, wie zuvor auch bei Indometacin, kein markanter Unterschied zu dem gemessenen Ausgangswert. Zellen der Ratte und des Menschen verhalten sich hier auch wieder gleichsinnig (Abbildung 17-22; Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment, von mindestens n=3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gesteigerte PGE₂-und PGI₂-Produktion Cox-2 abhängig zu sein scheint, sowohl in humanen wie in Typ₂-Zellen der Ratte.

Keinen Einfluss scheint die Cyclooxygenase, weder das Isoenzym Cox-1, noch das Isoenzym Cox-2, auf die Freisetzung von VEGF zu haben.

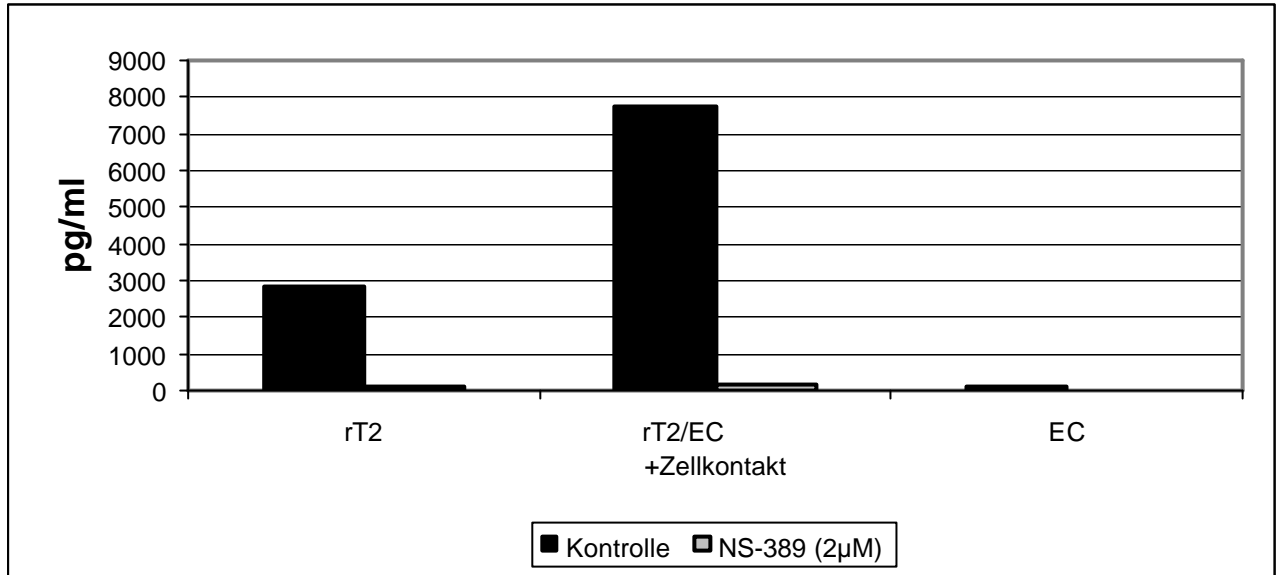
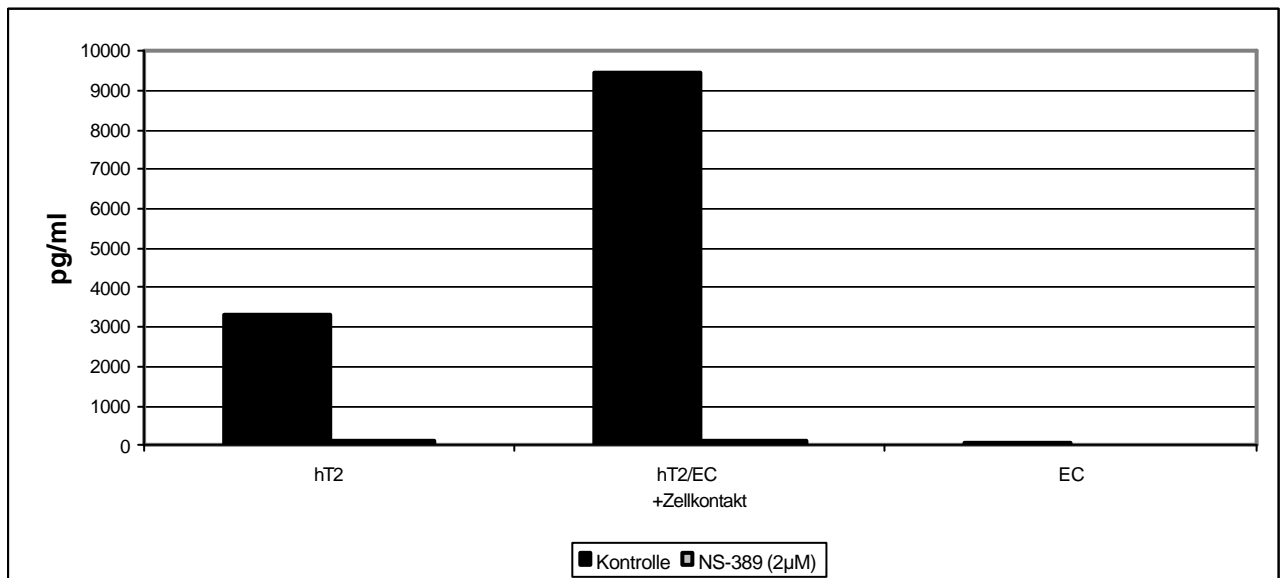
Abbildung 17-18: Detektion der Cox-2-Abhängigkeit der PGE₂-FreisetzungAbbildung 17: rTyp₂-Zellen, Freisetzung PGE₂ nach Inkubation mit NS-389Abbildung 18: hTyp₂-Zellen, Freisetzung PGE₂ nach Inkubation mit NS-389

Abbildung 17-18: Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment zu jedem Versuch. Untersucht wurde die PGE₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, hTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt. In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Bei den Versuchen wurde NS-389 nach IC₅₀ in einer Konzentration von 2,0 µM eingesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert. Danach sind die Überstände entnommen worden. Die PGE₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen.

(Abk.: T2:Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

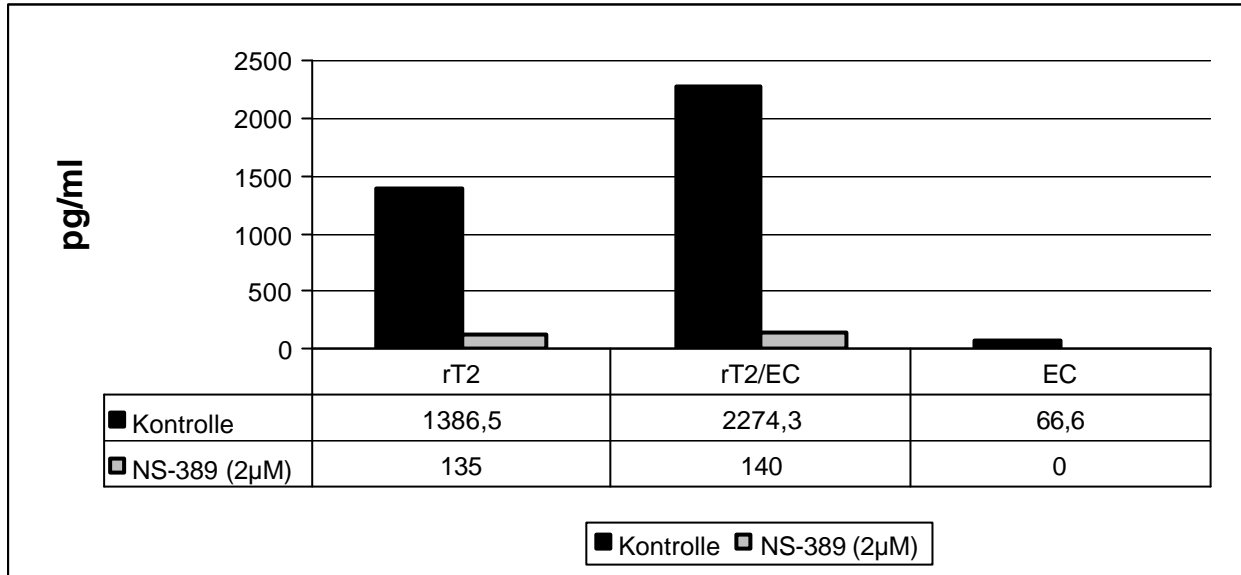
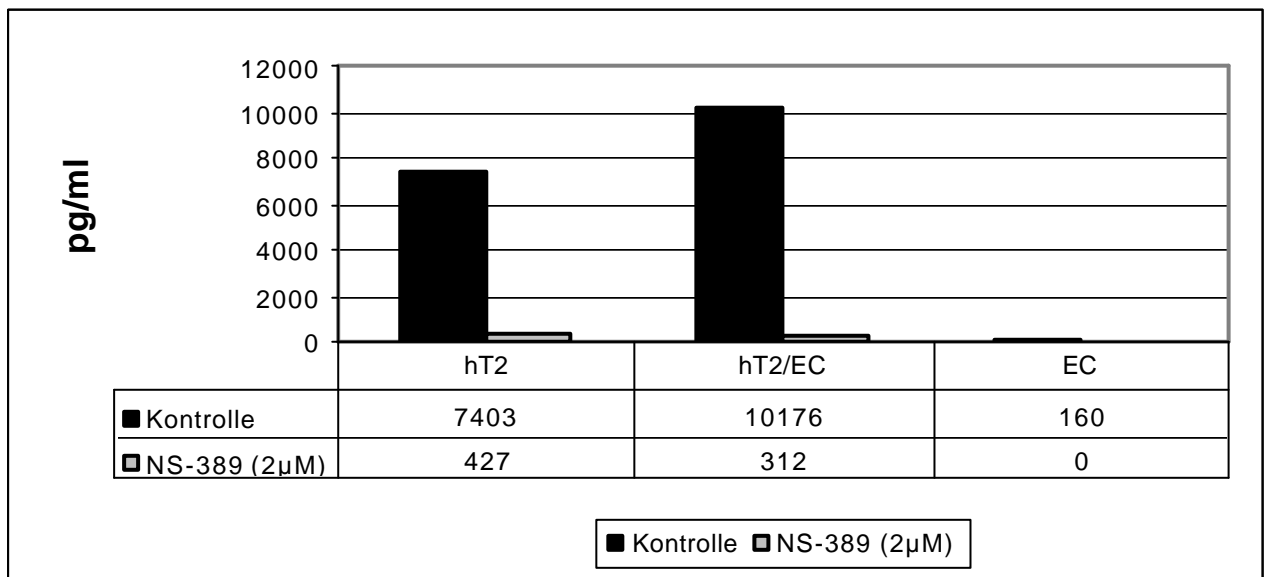
Abbildung 19-20: Detektion der Cox-2-Abhängigkeit der PGI₂ FreisetzungAbbildung 19: rTyp₂-Zellen, Freisetzung PGI₂ nach Inkubation mit NS-389Abbildung 20: hTyp₂-Zellen, Freisetzung PGI₂ nach Inkubation mit NS-389

Abbildung 19-20: Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment zu jedem Versuch. Untersucht wurde die PGI₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, hTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt. In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Bei den Versuchen wurde NS-389 nach IC₅₀ in einer Konzentration von 2,0 µM eingesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert. Danach sind die Überstände entnommen worden. Die PGI₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

Abbildung 21-22: Detektion der Cox-2-Abhängigkeit der VEGF Freisetzung

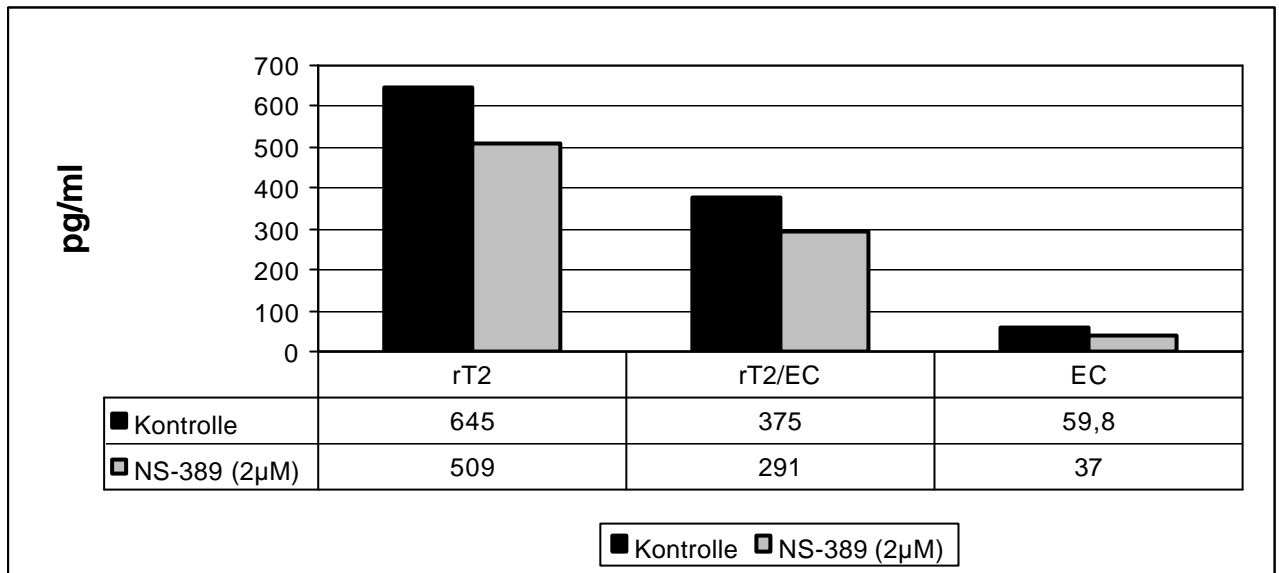
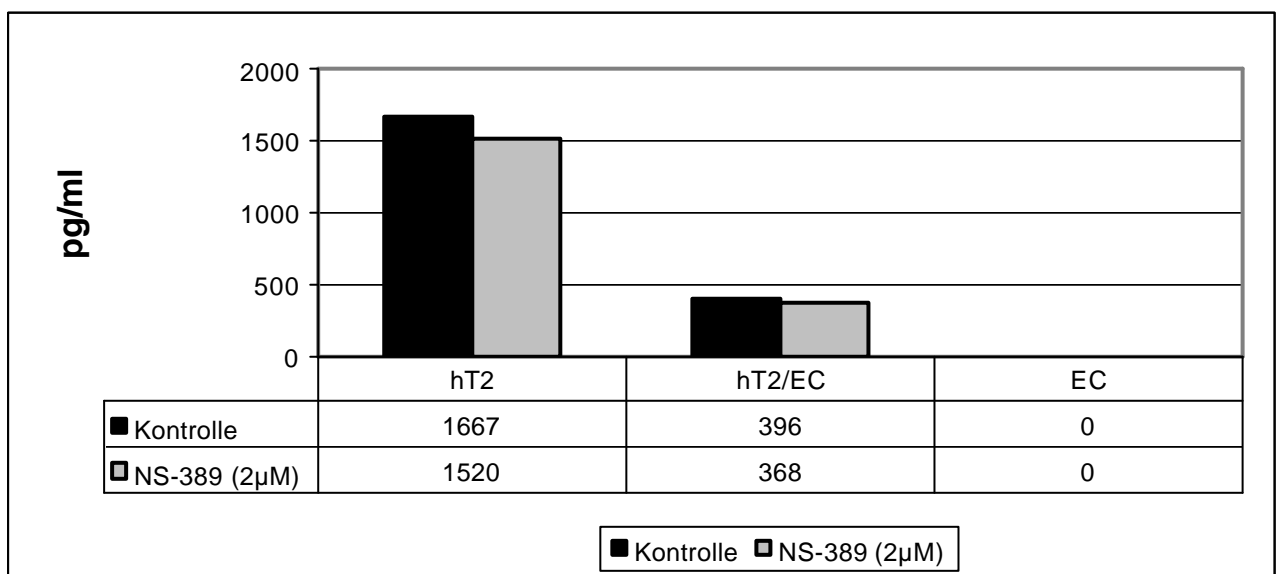
Abbildung 21: rTyp₂-Zellen, Freisetzung VEGF nach Inkubation mit NS-389Abbildung 22: hTyp₂-Zellen, Freisetzung VEGF nach Inkubation mit NS-389

Abbildung 21-22: Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment zu jedem Versuch. Untersucht wurde die VEGF-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, hTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt. In den mit Typ₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Bei den Versuchen wurde NS-389 nach IC₅₀ in einer Konzentration von 2,0 µM eingesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert. Danach sind die Überstände entnommen worden. Die VEGF-Werte wurden mittels ELISA gemessen.

(Abk.: T2:Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC +Zellkontakt; mit Zellkontakt)

4.6 PGE₂-, PGI₂-Messung in mit N₂ aufgeschlossenen Typ₂-Zellen

Mit Hilfe dieser Versuche sollte geklärt werden, ob es sich bei den höheren Werten, die in dem Ko-Kultur System mittels ELISA festgestellt wurden, um eine erhöhte Sekretion von innerhalb der Zelle gespeichertem PGE₂ bzw. PGI₂ handelt, oder ob das PGE₂ bzw. PGI₂ *de novo* in einer höheren Masse produziert und freigesetzt wird.

Hierfür wurden zwei parallele Ansätze des Ko-Kultur-Systems und den Typ₂-Zellen in mono-Kultur für 48 Stunden inkubiert. Im Anschluß wurde der eine Teil mit Hilfe von flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und anschließend wieder aufgetaut. Diese Prozedur wurde bis zu fünf mal wiederholt. Ziel war es, durch das wiederholte Einfrieren das in den Zellen gespeicherte PGE₂ durch Zerstörung („cracken“) der Zellmembran zu liberieren.

Die gemessenen Werte der gecrackten Zellen unterschieden sich nicht markant von den nicht gecrackten Zellen, das heisst, in den Typ₂-Zellen wurden PGE₂ und PGI₂ nicht wesentlich gespeichert.

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass die erhöhten PGE₂- und PGI₂-Werte nicht durch eine vermehrte Freisetzung von in den Zellen gespeicherten Prostaglandinen, sondern durch eine gesteigerte Neusynthese bedingt ist (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.7 Messung der PGE₂-, PGI₂- und VEGF-Werte im Ko-Kultur-System mit unmittelbarem Zellkontakt im Vergleich zu einem Ko-Kultur-System ohne Zellkontakt.

Typ₂-Zellen produzieren, wie oben gezeigt werden konnte, im direkten Kontakt mit mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen mehr PGE₂ und PGI₂ als mono-kultivierte Typ₂-Zellen.

Im Rahmen dieser Versuche sollte herausgearbeitet werden, ob für diese erhöhte Liberierung die unmittelbare Nähe der beiden Zelltypen nötig ist, oder ob dieser Effekt auch erreichbar ist, wenn die Zellen in der Ko-Kultur, jedoch ohne unmittelbare Nähe kultiviert werden.

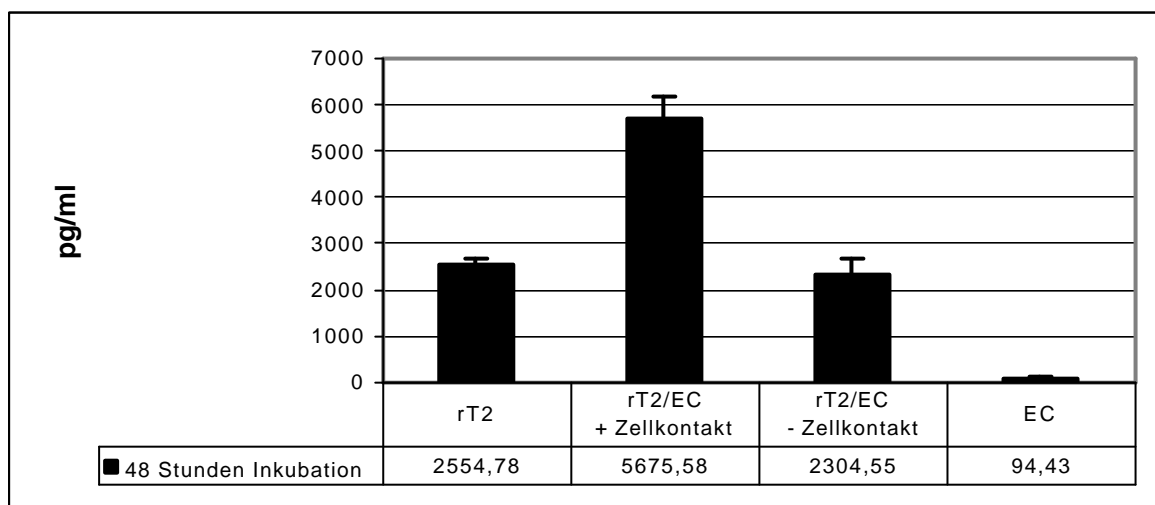
Hierfür sind die Endothelzellen auf dem Boden der Transwells ausgesät worden. Nach Isolation der Typ₂-Zellen sind diese auf die Oberseite der Transwellmembranen gegeben worden. Die Zellen standen in diesem System nicht in direktem, sondern nur über das Zellkulturmedium miteinander in Kontakt.

Wie zuvor sezernieren die Typ₂-Zellen im Ko-Kultur-System mit Zellkontakt bedeutend mehr PGE₂ und PGI₂ als die mono-kultivierten Typ₂-Zellen. Im Gegensatz dazu setzen die ko-

kultivierten Zellen ohne Zellkontakt keine markant höhere Menge der beiden Prostaglandine in das Zellkulturmedium frei. (Abbildung 23-24).

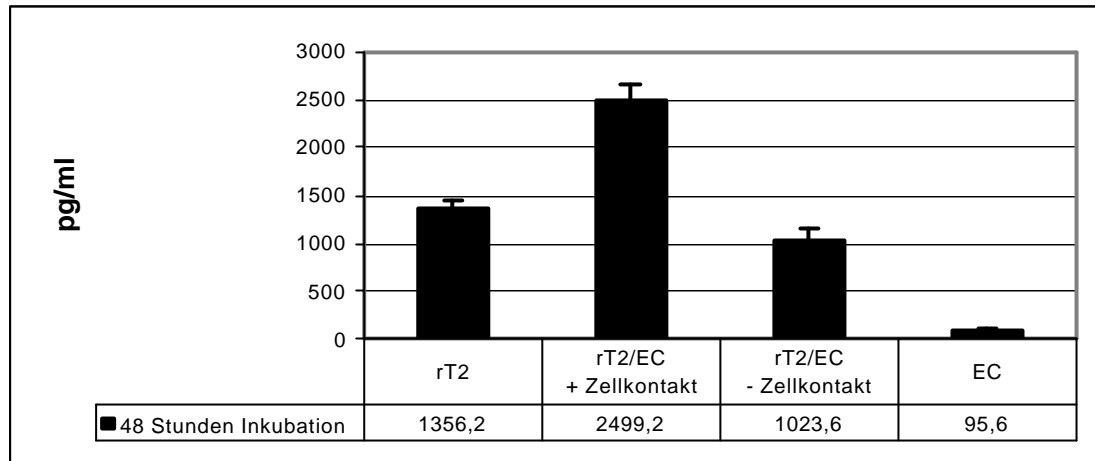
Hinsichtlich der VEGF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der ko-kultivierten Zellen mit bzw. ohne Zellkontakt besteht kein markanter Unterschied. Sowohl in dem System mit Zellkontakt, als auch bei der Kultivation der Typ₂-Zellen mit den HLMEC ohne Zellkontakt befand sich nach 48 Stunden Inkubation weniger VEGF im Medium als bei den mono-kultivierten Typ₂-Zellen (Abbildung 25).

Abbildung 23: PGE₂-Sekretion rTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit/ohne Zellkontakt



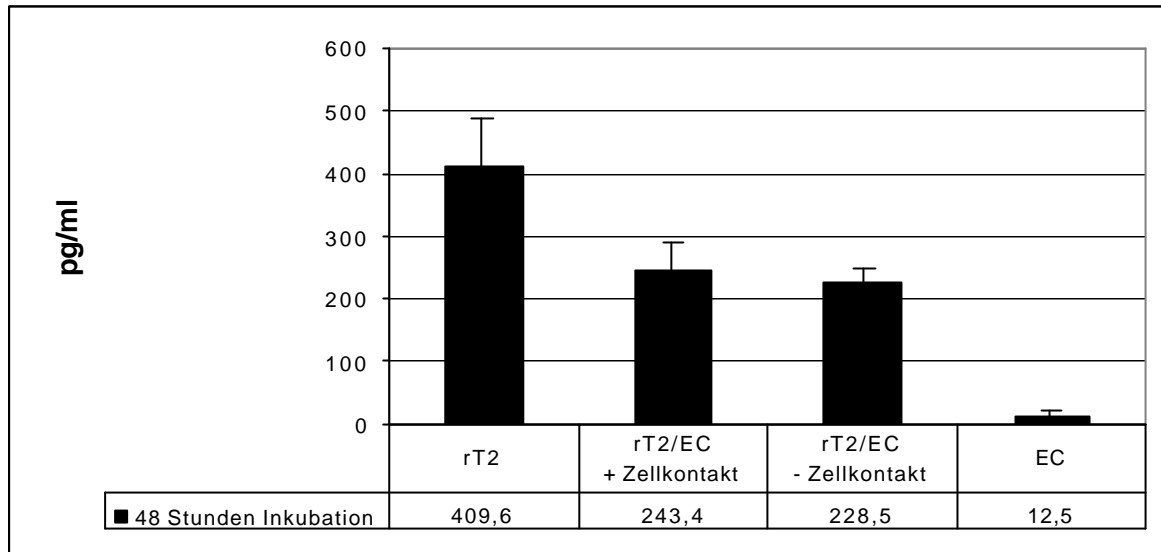
PGE₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit/ohne Zellkontakt. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGE₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2:Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt; -Zellkontakt: ohne Zellkontakt)

Abbildung 24: PGI₂-Sekretion rTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit/ohne Zellkontakt

PGI₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit/ohne Zellkontakt. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGI₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2:Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt; -Zellkontakt: ohne Zellkontakt)

Abbildung 25: VEGF-Sekretion rTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-Kultur mit/ohne Zellkontakt

VEGF-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, HLMEC und Ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit/ohne Zellkontakt. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die VEGF Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2:Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt; -Zellkontakt: ohne Zellkontakt)

4.8 Messung von erniedrigten PGE₂- und PGI₂-Werten nach Hemmung der endothelialen NO-Synthase in der Ko-Kultur

In den nachfolgenden Experimenten sollte versucht werden, Einblicke in den Signalmechanismus, der zu der Sekretionssteigerung von PGE₂ und PGI₂ in dem Ko-Kultur System führt, zu bekommen. Nach Studium der Literatur wurde Stickstoffmonoxid (NO) als möglicher Transmitter gesehen und für die Versuche ausgewählt.

Zunächst wurden hierbei die Endothelzellen, nachdem sie adhärent geworden waren, für 8 Stunden mit dem kompetitiven Inhibitor der NO-Synthase (NOS) N^G-Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) in einer Konzentration von 8 μ M präinkubiert. Anschließend wurden die Typ₂-Zellen gemäß dem Protokoll für das Ko-Kultur System mit Zellkontakt ausgesät. Die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert und dann der Zellkulturüberstand abgenommen.

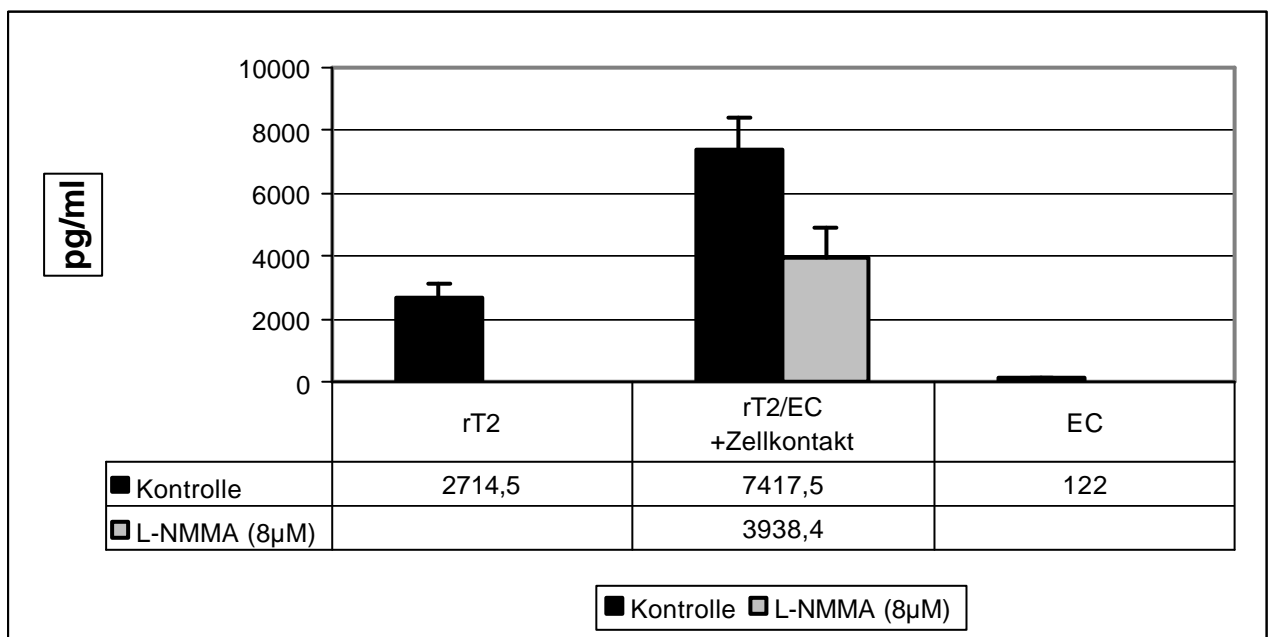
Die Ergebnisse zeigen, dass die Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem Hemmer der NO-Synthase L-NMMA die Sekretion von PGE₂ und PGI₂ im Ko-Kultur-System signifikant senken kann.

Die mono-kultivierten Typ₂-Zellen sezernierten in den durchgeführten Versuchen $m = 2714,6$ pg/ml ± 447 PGE₂ und $m = 1423,5 \pm 188$ pg/ml PGI₂.

Die ko-kultivierten Zellen setzten in den 48 Stunden $m = 7417,6 \pm 1007$ pg/ml PGE₂ und $m = 2302,5 \pm 249$ pg/ml PGI₂ frei.

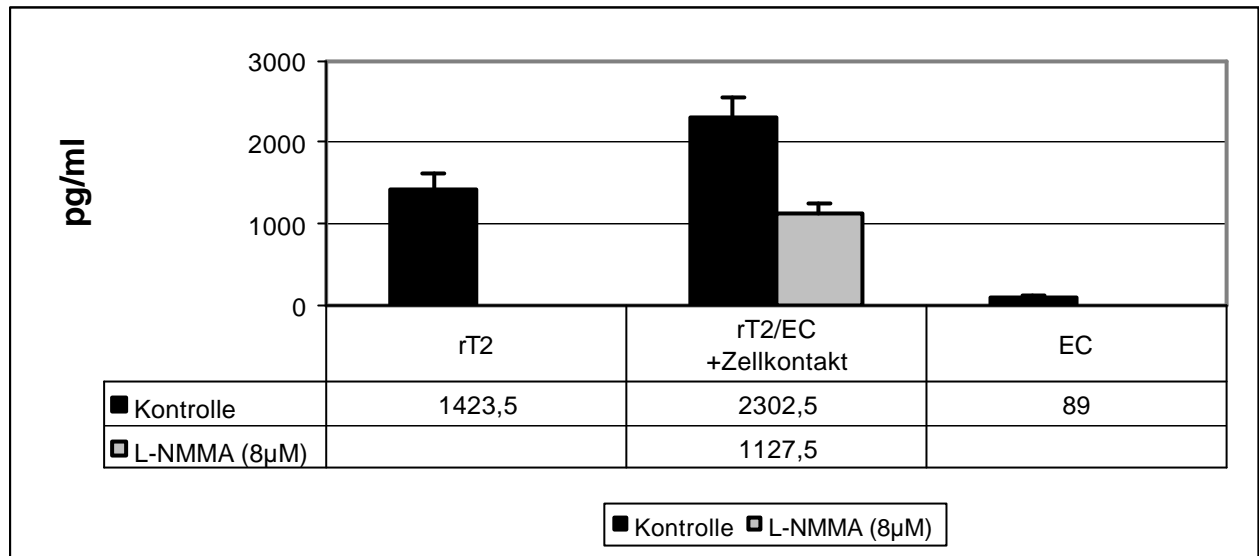
Nach Präinkubation der Endothelzellen mit L-NMMA reduzierte sich die PGE₂-Freisetzung auf $< 40\%$ des Wertes gegenüber den nicht vorinkubierten Zellen ($3738,4 \pm 950$ pg/ml vs. $7417,6 \pm 1007$ pg/ml). Die Freisetzung von PGI₂ hat sich auf $< 50\%$ des Wertes im Vergleich mit den mit L-NMMA inkubierten Zellen reduziert ($1127,5 \pm 127$ pg/ml vs. $2302,5 \pm 249$ pg/ml) (Abbildung 26-27).

Abbildung 26: Messung PGE₂ mit/ohne Präinkubation der HLMEC mit L-NMMA



PGE₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Nach Adhärenz der Endothelzellen wurden diese mit L-NMMA (8µM) für 8 Stunden vorinkubiert. Erst dann wurden die Typ₂-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGE₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2:Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

Abbildung 27: Messung PGI₂ mit/ohne Präinkubation der HLMEC mit L-NMMA

PGI₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten Typ₂-Zellen / HLMEC mit Zellkontakt. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. In den Wells mit HLMEC wurden 60.000 Zellen ausgesät. Nach Adhärenz der Endothelzellen wurden diese mit L-NMMA (8µM) für 8 Stunden vorinkubiert. Erst dann wurden die Typ₂-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 48 Stunden kultiviert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGI₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen; EC: HLMEC; T2/EC: Ko-Kultur Typ₂-Zellen mit HLMEC; +Zellkontakt: mit Zellkontakt)

4.9 Messung von erhöhten PGE₂- und PGI₂-Werten nach Stimulierung von Typ₂-Zellen mit NO und L-Arginin

Im Rahmen dieser Versuchsreihen sollte geklärt werden, ob Stickstoffmonoxid in der Lage ist, Typ₂-Zellen zur Produktion von PGE₂ und PGI₂ zu stimulieren und ob die Werte mit den PGE₂ - bzw. PGI₂ -Konzentrationen im Ko-Kultur-System vergleichbar sind.

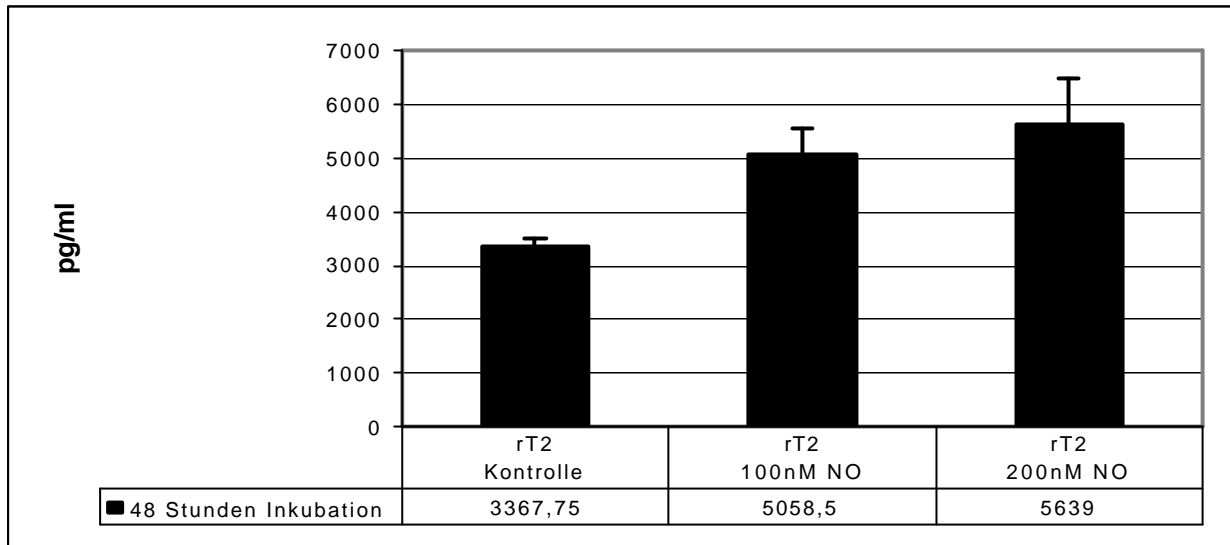
Als NO-Donator wurde Spermine NONOate verwendet. Zusätzlich wurde L-Arginin als Vorstufe von NO eingesetzt. L-Arginin wird in die Zelle über einen kationischen Aminosäuretransporter aufgenommen und durch die NO-Synthase in zwei Schritten in Stickstoffmonoxid umgewandelt.

Nach Isolation wurden je 2 Millionen Typ₂-Zellen auf die Transwellmembranen ausgesät. Nach erfolgter Adhärenz wurden die Zellen eines Versuchsansatzes mit 100nM bzw. 200nM Spermine NONOate und die Typ₂-Zellen der anderen Versuchsreihe mit 10µM und 100µM L-Arginin für 48 Stunden inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass NO die PGE₂- und PGI₂-Freisetzung signifikant erhöhen kann. Nach 48 Stunden Inkubation ließ sich in dem Zellkulturüberstand der Typ₂-Zellen ohne Stimulation insgesamt $m = 3367,8 \pm 137$ pg/ml PGE₂ nachweisen. Bei Inkubation mit 100nM Spermine NONOate konnten im Überstand $m = 5058,5 \pm 492$ pg/ml und nach Stimulation mit 200nM Spermine NONOate $m = 5639 \pm 851$ pg/ml PGE₂ gemessen werden. Auch die Inkubation der Typ₂-Zellen mit L-Arginin konnte eine signifikant erhöhte Freisetzung von PGE₂ aufzeigen. Typ₂-Zellen stimuliert mit 10µM L-Arginin produzierten insgesamt $m = 7101 \pm 1437$ pg/ml PGE₂, nach 48 Stunden Inkubation mit 100µM L-Arginin ließen sich insgesamt $m = 7278,5 \pm 2680$ pg/ml PGE₂ nachweisen (Abbildung 28-29).

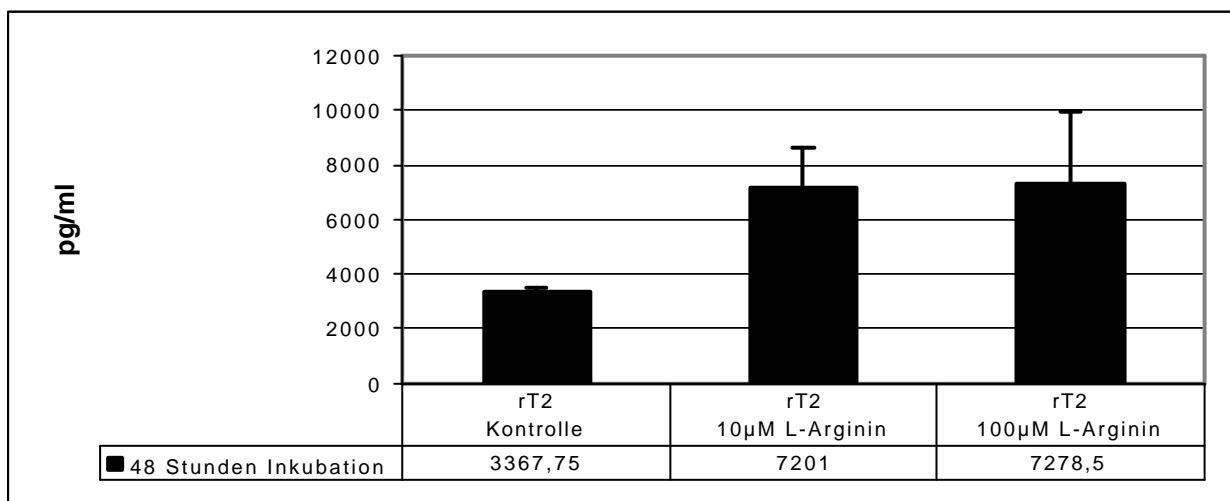
Auch bei der PGI₂-Freisetzung lässt sich dies nachweisen, hier erreichten die Werte jedoch nur nach Stimulation mit NO, nicht aber mit L-Arginin Signifikanz. Nach 48 Stunden Inkubation ließ sich in dem Zellkulturüberstand der Typ₂-Zellen ohne Stimulation insgesamt $m = 2890,5 \pm 71$ pg/ml PGI₂ nachweisen. Bei Inkubation mit 100nM Spermine NONOate konnten im Überstand $m = 3726 \pm 185$ pg/ml und nach Stimulation mit 200nM Spermine NONOate $m = 4925,5 \pm 178$ pg/ml PGI₂ gemessen werden. Auch nach der Inkubation der Typ₂-Zellen mit L-Arginin konnte eine erhöhte Freisetzung von PGI₂ aufzeigen. Typ₂-Zellen stimuliert mit 10µM L-Arginin produzierten insgesamt $m = 3334 \pm 209$ pg/ml PGI₂, nach 48 Stunden Inkubation mit 100µM L-Arginin ließen sich $m = 3480 \pm 160$ pg/ml PGE₂ nachweisen (Abbildung 30-31).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die PGE₂-Freisetzung mittels des NO-Donators Spermine NONOate und der Stickstoffmonoxid-Vorstufe L-Arginin verdoppeln lässt. Die Produktion von PGI₂ lässt sich nach Inkubation mit Spermine NONOate um das 1,7-Fache steigern, die Inkubation mit L-Arginin erhöht die PGI₂-Freisetzung um das 1,2-Fache.

Abbildung 28: Messung PGE₂ nach Inkubation von Typ₂-Zellen mit Spermine NONOate

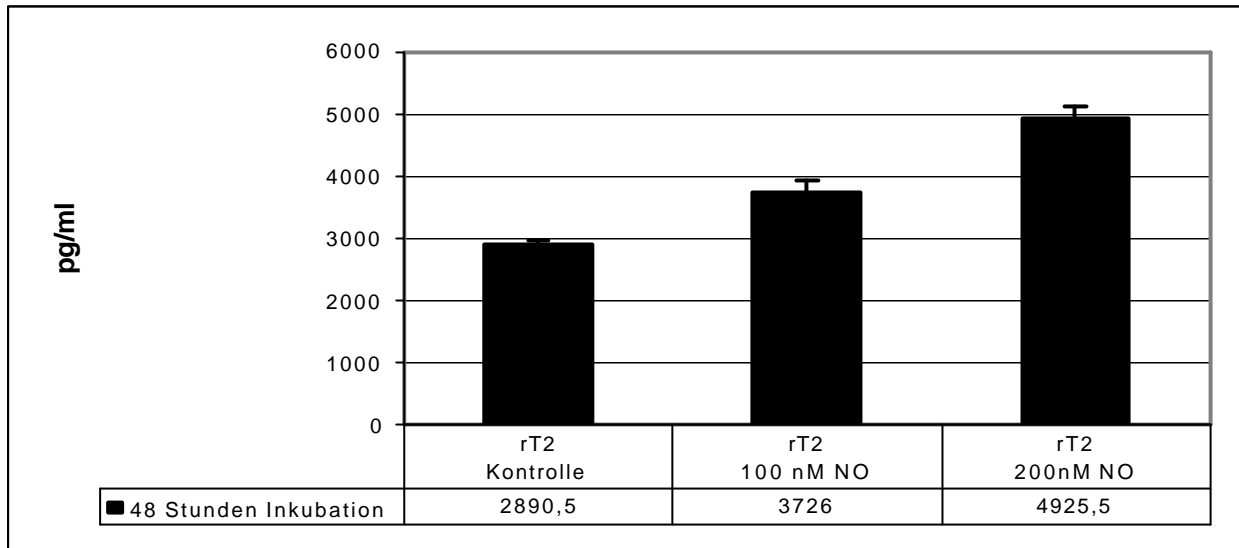
Bestimmung der PGE₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. Nach Adhärenz der Zellen wurden sie für 48 Stunden mit 100 nM bzw. 200 nM des NO-Donators Spermine NONOate inkubiert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGE₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen)

Abbildung 29: Messung PGE₂ nach Inkubation von Typ₂-Zellen mit L-Arginin

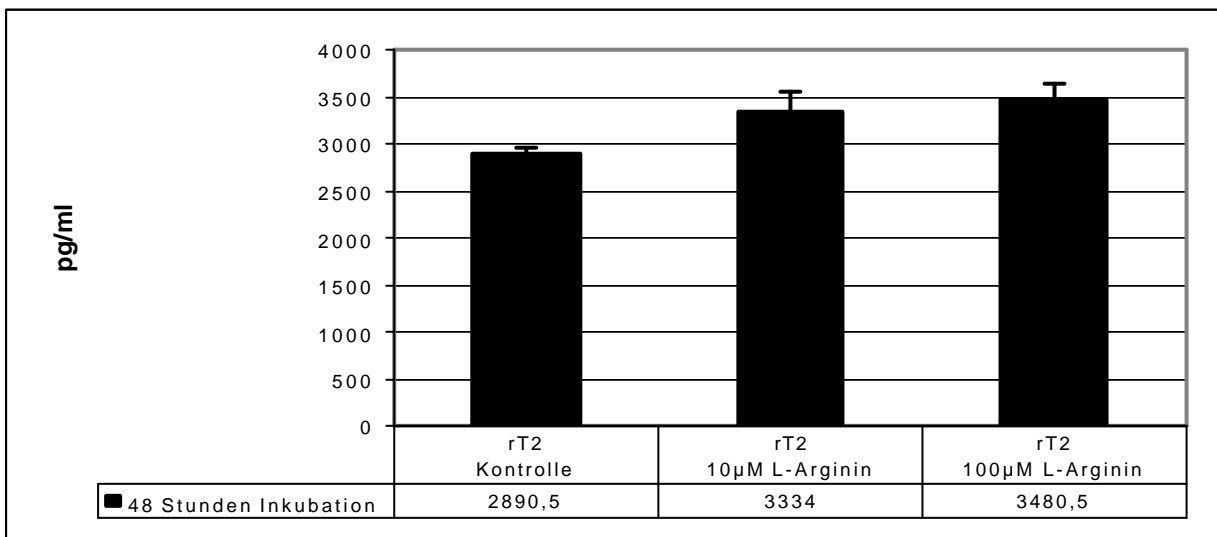
Bestimmung der PGE₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. Nach Adhärenz der Zellen wurden sie für 48 Stunden mit 10 µM bzw. 100 µM der NO-Vorstufe L-Arginin inkubiert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGE₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen)

Abbildung 30: Messung PGI₂ nach Inkubation von Typ₂-Zellen mit Spermine NONOate

Bestimmung der PGI₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. Nach Adhärenz der Zellen wurden sie für 48 Stunden mit 100 nM bzw. 200 nM des No-Donators Spermine NONOate inkubiert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGI₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen)

Abbildung 31: Messung PGI₂ nach Inkubation von Typ₂-Zellen mit L-Arginin

Bestimmung der PGI₂-Freisetzung von rTyp₂-Zellen. In den mit rTyp₂-Zellen kultivierten Wells befanden sich 2 Millionen Zellen. Nach Adhärenz der Zellen wurden sie für 48 Stunden mit 10 μ M bzw. 100 μ M der No-Vorstufe L-Arginin inkubiert, dann sind die Überstände entnommen worden. Die PGE₂-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2: Typ₂-Zellen)

4.10 Messung von VEGF nach Hemmung der endothelialen NO-Synthese und nach Stimulation der Typ₂-Zellen mit NO bzw. L-Arginin

Neben der Bestimmung von PGE₂ und PGI₂ wurden auch parallel zu den Versuchen 4.8 und 4.9 die VEGF-Werte ermittelt.

Nach Vorinkubation der HLMEC mit dem NO-Synthesehemmer LMNNA zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den VEGF-Werten der unstimulierten Kontrollgruppe. Im Ko-Kultur-System ließen sich wie zuvor weniger hohe VEGF-Konzentrationen im Vergleich zu den mono-kultivierten Typ₂-Zellen messen. Auch nach Inkubation der Typ₂-Zellen mit dem NO-Donator NONOate und der NO-Vorstufe L-Arginin zeigte sich kein markanter Unterschied hinsichtlich der VEGF-Konzentration im Kulturmedium (Ergebnisse nicht angezeigt).

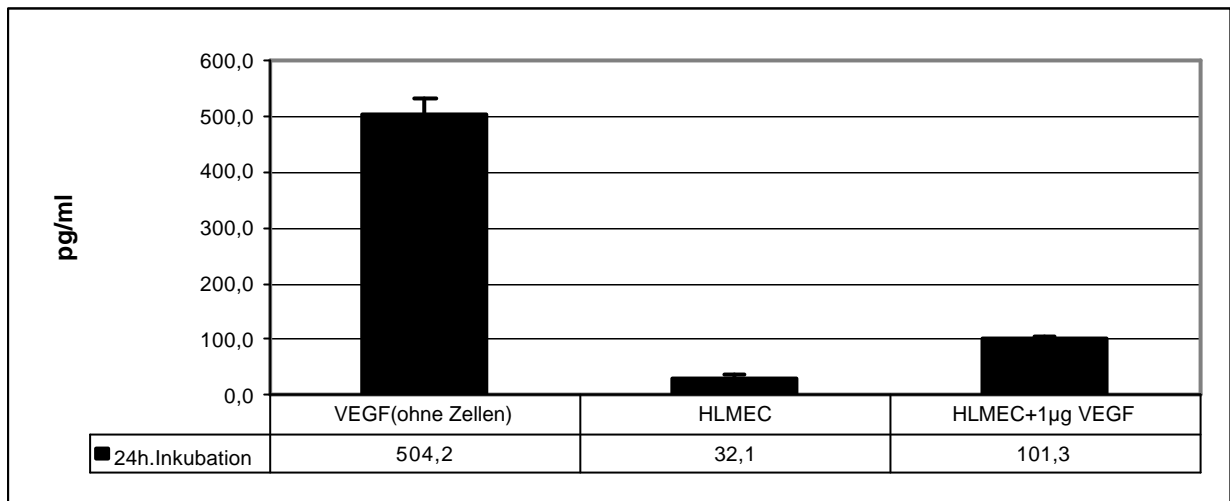
4.11 Inkubation von HLMEC mit VEGF

Mit Hilfe dieser Versuche sollte geklärt werden, inwieweit HLMEC in der Lage sind, VEGF zu binden bzw. zu internalisieren.

Auf den Boden von 12-Well-Platten wurden nach Beschichtung mit 50µg Fbronektin je 60000 HLMEC pro Well in 1 ml HLMEC-Medium ausgesät. Anschliessend wurden ein Teil der Zellen mit je 1µg/ml VEGF inkubiert. Als Kontrollen dienten HLMEC ohne Zusatz von exogenem VEGF und Wells ohne Zellen, in welche je 1µg VEGF zugesetzt wurde. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium entnommen und mittels ELISA die VEGF-Konzentration ermittelt.

Nach 24 Stunden Inkubation konnten von dem zugegebenen VEGF noch $m=504,2 \pm 26$ pg/ml in der Kontrolle ohne Zellen nachgewiesen werden. Die HLMEC sezernierten innerhalb dieses Zeitraumes $m=32,1 \pm 4$ pg/ml in das Kulturmedium. In den Wells mit Zellen und exogen zugesetzten VEGF konnten noch $m=101,3 \pm 5$ pg/ml gemessen werden. Dies zeigt, dass in diesen Wells noch 70 pg/ml des exogen zugesetzten VEGF nachweisbar ist (Abbildung 31).

Abbildung 31: Messung VEGF nach 24 Stunden Inkubation von HLMEC mit/ohne Zugabe von exogenem VEGF



Bestimmung der VEGF-Werte nach 24 Stunden Inkubation. Es wurden Wells ohne Zellen in 1 ml HLMEC-Medium mit 1µM exogenem VEGF, 60000 HLMEC in 1 ml Medium mit 1µM VEGF und HLMEC ohne Zusatz von VEGF für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entnommen. Die VEGF-Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.12 Widerstandsmessung: Indikator eines intakten Layers bei Kultivierung von Alveolarepithelzellen in der ko- bzw. mono-Kultur

Der epitheliale Widerstand wurde als Typ₁-Zellen-spezifische Größe gemessen, um den Verlust oder Erhalt der Typ₂-zellspezifischen Charakteristika in Abhängigkeit vom Kultursystem zu betrachten. Da Typ₂-Zellen keinen epithelialen Zellverband aufbauen, bleibt hier der epitheliale Widerstand niedrig. Somit deutet ein niedriger epithelialer Widerstand auf eine Konservierung der Zellen mit deren typischen Charakteristika hin.

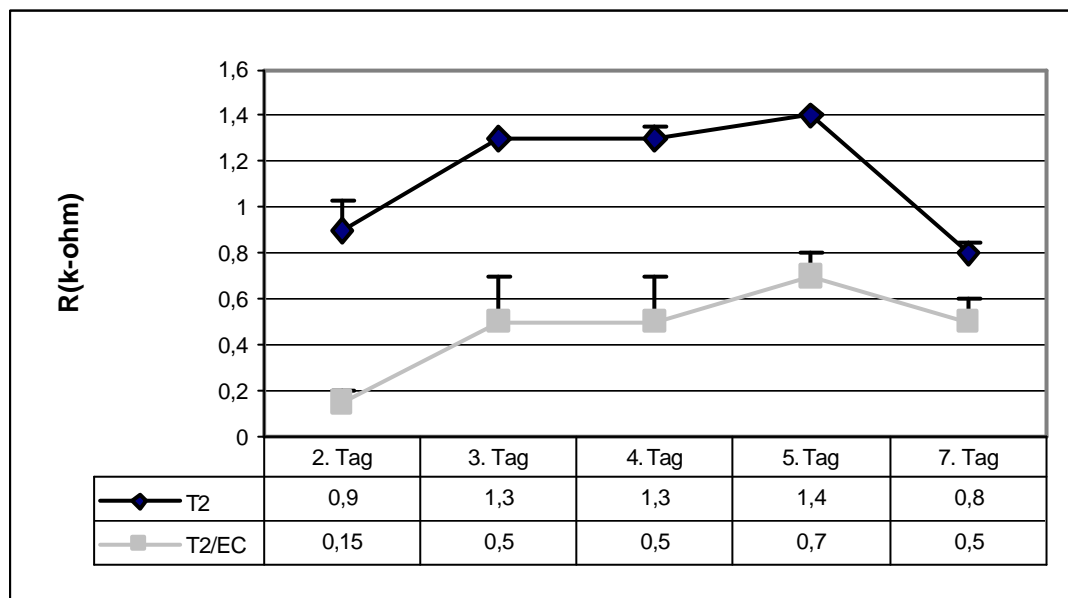
Wie zuvor wurden die Zellen nach Isolation und Kultur den Versuchen zugeführt und wie in 3.2.7 beschrieben ausgesät. Gemessen wurden immer parallele Ansätze von mono-kultivierten Typ₂-Zellen, HLMEC und ko-kultivierten Typ₂-Zellen mit Zellkontakt.

Die Widerstände der Typ₂-Zellen stiegen vom zweiten Tag von $0,9 \pm 0,13$ kΩ bis zum fünften Tag der Kultivierung auf $1,4 \pm 0$ kΩ an. Bis zum siebten Tag fielen sie wieder auf $0,8 \pm 0,05$ kΩ ab.

Die Widerstände der ko-kultivierten Zellen blieben niedrig. Sie stiegen bis zum fünften Tag von $0,15 \pm 0,05 \text{ k}\Omega$ auf $0,7 \pm 0,1 \text{ k}\Omega$ an und fielen dann bis zum siebten Tag auf $0,5 \pm 0,1 \text{ k}\Omega$ ab.

Die Widerstände beider Systeme steigen also in den ersten fünf Tagen an und sanken anschließend wieder. Die Widerstände in den ko-kultivierten Wells waren jedoch im gesamten Messzeitraum um über 100 % niedriger als in den mono-kultivierten Wells.

Abb.32: Folge der Ko-Kultivierung mit Zellkontakt auf den epithelialen Widerstand von Alveolarepithelzellen



Die $r\text{Typ}_2$ -Zellen wurden nach ihrer Isolierung den beiden Systemen zugeführt. Der erste Tag der Messung entspricht 48 Stunden nach Isolierung der Zellen. Die Mittelwerte $\pm \text{SEM}$ stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

(Abk.: T2= Typ_2 -Zellen; EC= HLMEC; T2/EC= Ko-Kultur aus Typ_2 -Zellen mit HLMEC)

5. Diskussion

Das ARDS ist ein häufiges Krankheitsbild mit einer Letalität von bis zu 50 %. Im Rahmen dieses Krankheitsbildes kommt es zu einer Reihe komplizierter und vielfach nicht genau verstandener pathologischer Prozesse. Hauptschädigungsort ist hierbei die alveolo-kapilläre Membran, bestehend aus den Alveolarepithelzellen Typ₁ und Typ₂ sowie den mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen.

Es sind viele Studien bekannt, in denen die alveolo-endotheliale Barriere anhand von Tiermodellen - isolierten Lungen- oder Ganztiermodellen- in Bezug auf die Pathogenese und morphologischen Auswirkungen des ARDS *in vivo* charakterisiert worden ist.

Im Gegensatz dazu sind nur wenige Studien bekannt bei welchen die Blut-Gas-Schranke als *in vitro*-Modell untersucht worden ist (9, 10, 107, 143, 144).

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-Modell der alveolo-kapillären Membran zu etablieren, bei dem die Typ₂-Zellen und die HLMEC zwar streng und eindeutig voneinander getrennt sind, sie sich jedoch in so unmittelbarer Nähe zueinander befinden, dass die Diffusionsstrecken minimalisiert werden und ein direkter Zellkontakt möglich ist. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die beiden Zelltypen auf den zwei Seiten einer Transwellmembran kultiviert. Die Blut-Gas-Schranke hat an ihren dünnsten Stellen eine Dicke von 1-2 µm. Mit Hilfe der Filtermembranen konnte der Abstand der Zellen zwar minimiert werden, die benutzen Membranen sind jedoch bis zu 10-fach dicker als die Basalmembran *in vivo*. Es ist aber zur Zeit kein System bekannt, welches eine strenge Trennung der Zellen gewährleistet und die Diffusionstrecke zwischen den Zellen noch weiter verringert.

Nach Etablierung der alveolo-kapillären Membran sollte in dieser Arbeit der Einfluss der beim ARDS eine gewichtige Rolle spielenden Parameter PGE₂, PGI₂ und VEGF untersucht werden. Desweiteren sollte dieses *in vitro*-Modell im Hinblick auf die Entwicklung des elektrischen Widerstandes betrachtet werden.

Es ist zur Zeit keine Studie bekannt, bei der das Verhalten dieser Parameter in einem Ko-Kultur-Modell untersucht worden ist. Auch existieren im Moment keine Untersuchungen, bei denen diese Barriere aus primär isolierten Zellen rein humanen Ursprungs erstellt wurde. In den meisten Fällen, wie auch in Teilen dieser Arbeit, ist zumindest ein Zelltyp von einer anderen Spezies verwendet worden. Es ist zur Zeit nur eine Arbeit bekannt, bei der zur Etablierung der alveolo-kapillären Membran einzig humane Zellen Verwendung

fanden, hier wurde jedoch als Typ₂-Zellen die immortalisierte Tumorzelllinie A549 genutzt (107).

5.1 Induktion der Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ in der Ko-Kultur aus Typ₂-Zellen und HLMEC

Die beiden cyclooxygenase-abhängigen Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ sind wichtige Mediatoren in der Pathogenese von Lungenerkrankungen wie dem ARDS. Viele Studien konnten zeigen, dass es im Rahmen der Entwicklung des ARDS zu einer erhöhten Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Typ₂-Zellen der Lunge kommt, und dass Typ₂-Zellen in der Lage sind diese Prostaglandine zu synthetisieren (9, 10, 59, 110, 111). Die Hypothese dieser Arbeit lautete, dass es zwischen den beiden in der Alveole dicht beieinander liegenden Zellen, den Typ₂-Zellen und den HLMEC, zu Zell-Zell-Interaktionen kommt und dies auch die Produktion der Prostaglandine beeinflusst.

Uchida et al. (108) haben gezeigt, dass die Ko-Kultivation von zwei verschiedenen, im Gewebeverbund in unmittelbarer Nähe liegenden Zelltypen zu einer erhöhten PGE₂-Synthese führt. Anhand von glomerulären Endothelzellen und mesangialen Zellen der Nieren, die nur durch eine dünne Membran voneinander getrennt ko-kultiviert wurden, konnte eine erhöhte PGE₂-Synthese festgestellt werden. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die in Ko-Kultur gehaltenen Zellen innerhalb von 24 Stunden mehr als doppelt soviel PGE₂ in das Kulturmedium freigesetzt haben als die mono-kultivierten Zellen.

Auch am Beispiel von Fibroblasten der Gingiva und Lymphozyten konnte diese Beeinflussung nachgewiesen werden (109). Die Ko-Kultivation dieser beiden Zelltypen führte zu einem signifikanten Anstieg der PGE₂-Sekretion. Der Arbeitsgruppe gelang es ebenfalls nachzuweisen, dass es für die gesteigerte PGE₂-Produktion des direkten Kontaktes zwischen den Fibroblasten und den Lymphozyten bedarf. In ihren Versuchen konnten sie zeigen, dass Fibroblasten und Lymphozyten, die mit Zellkontakt ko-kultiviert wurden, nicht nur erheblich mehr PGE₂ produzieren als die mono-kultivierten Zellen, sondern auch mehr als die in einem Ko-Kultur-System kultivierten Zellen, bei denen kein Zellkontakt bestand, sondern lediglich eine Verbindung über das Kulturmedium.

In Übereinstimmung mit den oben erläuterten Ergebnissen konnte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch an Typ₂-Zellen und pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen gezeigt werden.

Typ₂-Zellen sind in der Lage PGE₂ und PGI₂ zu bilden. HLMEC jedoch produzieren nur sehr geringfügige Mengen dieser Prostanoiden. Sowohl PGE₂ als auch PGI₂ wurden nach 48 Stunden Inkubation in einem Ko-Kultur-System mit unmittelbarem Zellkontakt, bei dem die Zellen auf den zwei Seiten einer Transwellmembran ausgesät wurden, in höheren Konzentrationen nachgewiesen. Innerhalb dieses Zeitraumes sezernierten die ko-kultivierten Typ₂-Zellen der Ratte mit Zellkontakt doppelt soviel PGE₂ im Vergleich zu den mono-kultivierten Zellen. Auch bei der Freisetzung von PGI₂ zeigte sich im Ko-Kultur-System mit Zellkontakt eine markante Steigerung. Diese Ergebnisse ließen sich auch im rein humanen System aus Typ₂-Zellen des Menschen und den humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen bestätigen, auch wenn hier die Steigerung der Synthese mit dem jeweils 1,3-fachen Wert für PGE₂ und PGI₂ etwas weniger ausgeprägt war als bei den Typ₂-Zellen der Ratte.

Ebenso haben die Versuche ergeben, dass die Ko-Kultivation alleine nicht ausreichend ist, die Prostaglandin-Synthese zu erhöhen. Dafür ist zusätzlich ein unmittelbarer Kontakt der beiden Zelltypen notwendig. Die Messung von PGE₂ und PGI₂ im Ko-Kultur-System, bei dem die Zellen nur über das Kulturmedium miteinander in Kontakt standen, zeigte nach 48 Stunden keinen signifikanten Unterschied in der Synthese dieser beiden Mediatoren. Die Werte bewegten sich auf dem selben Niveau wie die Konzentrationen, die bei den mono-kultivierten Zellen nach 48 Stunden nachgewiesen wurden.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die erhöhte PGE₂-und PGI₂-Sekretion im Ko-Kultur-System von Typ₂-Zellen entweder durch Ausbildung direkter Zell-Zell-Verbindungen entsteht oder von den Endothelzellen Faktoren freigesetzt werden müssen, welche die Synthese erhöhen. Möglich ist hierbei, dass diese Stoffe entweder nur in so geringen Mengen gebildet werden, dass im Zellkulturmedium nicht die erforderlichen Konzentrationen erreicht werden, um die Synthese zu erhöhen oder dass der synthetisierte Stoff eine für die Diffusionsstrecke zu kurze Halbwertszeit besitzt, um im Ko-Kultur-System ohne direkten Zellkontakt von den Endothelzellen zu den Epithelzellen zu gelangen.

5.2 Die gesteigerte Prostaglandinsynthese im Ko-Kultur-Modell aus Typ₂-Zellen und HLMEC ist Cyclooxygenase-abhängig

Die Prostaglandinvorstufe PGH₂ wird durch Cyclooxygenasen aus Arachidonsäure gebildet. Im menschlichen Organismus existieren zwei verschiedene Isoformen dieses Enzyms, die Cox-1 und die Cox-2.

Man geht davon aus, dass die Cox-1 in den meisten Organen als das konstitutive der beiden Isoenzyme vorkommt und für den Großteil der physiologischen Prozesse verantwortlich ist (62,141). Die Cox-2 ist hingegen dasjenige Isoenzym, welches auf einen (z.B. inflammatorischen) Reiz hin hochreguliert wird (141).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte jedoch von Asano et al. (110) gezeigt werden, dass die konstitutive und vornehmlich vorkommende Isoform in den Epithelzellen der Lunge die Cox-2 darstellt. Mit Hilfe von A549-Zellen konnten sie nachweisen, dass die Synthese von PGE₂ in diesen Zellen unter unstimulierten Konditionen Cox-2-abhängig ist. Es zeigte sich, dass nach Inkubation der A549-Zellen mit den beiden spezifischen Cox-2-Hemmern NS-398 und L-745,337 die Produktion von PGE₂ über 80 % im Vergleich zu den nicht gehemmten Zellen gesenkt werden konnte. Ebenso konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass in diesen immortalisierten Alveolarepithelzellen ohne Stimulation die Expression der Cox-2-mRNA höher war als die Expression der Cox-1-mRNA.

Auch Ermert et al. (111) und Baber et al. (112) konnten anhand von Rattenlungen nachweisen, dass Cox-2-mRNA unter physiologischen Verhältnissen exprimiert wird.

Diese Arbeit sollte zeigen, dass auch in primär isolierten Typ₂-Zellen des Menschen wie der Ratte die PGE₂- und PGI₂-Produktion Cox-2-abhängig ist. Desweiteren sollte die Frage geklärt werden, ob die festgestellte erhöhte PGE₂- bzw. PGI₂-Synthese im Ko-Kultur-Modell ebenfalls eine Cox-2-Abhängigkeit aufweist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass Typ₂-Zellen PGE₂ und PGI₂ unter unstimulierten Bedingungen Cox-2-abhängig synthetisieren. Im Vergleich zu den Kontrollwerten konnte mit dem unspezifischen Cox-1/2-Hemmer Indometacin, aber auch mit dem spezifischen Cox-2-Hemmer NS-398, die Synthese dieser beiden Prostaglandine um über 80 % gesenkt werden.

Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass auch die gesteigerte Prostaglandinsynthese im Ko-Kultur-Modell mit Zellkontakt Cox-2-abhängig ist. Auch hier konnten die Werte mit Hilfe von NS-398 auf die Konzentrationen von mit diesem Cox-2-Hemmer inkubierten, mono-kultivierten Typ₂-Zellen gesenkt werden.

5.3 Regulation der Prostaglandinsynthese durch NO

Nach den gewonnenen Erkenntnissen über die erhöhte PGE₂- und PGI₂-Synthese in dem Ko-Kultur-Modell und der Suche nach möglichen Substanzen, die als Transmitter für diese Ergebnisse möglich sein könnten, trat nach der Literaturrecherche der Stoff Stickstoffmonoxid (NO) immer mehr in das Blickfeld des Interesses. Aufgrund der verfügbaren Literatur wurde entschieden, die Versuche wie in 4.7 und 4.8 beschrieben, durchzuführen.

Im Laufe der Jahre haben sich viele Arbeitsgruppen mit der Frage beschäftigt, ob zwischen den beiden Enzymen Cyclooxygenase und NO-Synthase wechselseitige Einflüsse bestehen.

Hemmung der Prostaglandin-Sekretion und Cox-2-Expression durch NO

Patel et al. (120) haben gezeigt, dass in aktivierten murinen Makrophagen (RAW 264,7) ein Zusammenhang zwischen der PGE₂-Synthese und der NO-Sekretion besteht. Nach Inkubation von LPS-stimulierten RAW 264,7-Zellen mit dem NOS-Inhibitor L-NMMA konnte eine dosis-abhängige Steigerung der PGE₂-Synthese und Cox-2-Expression nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse konnten auch an peritonealen Makrophagen der Ratte gezeigt werden (121). Auch diese Zellen reagierten auf die Stimulation mit LPS mit einer erhöhten Synthese von PGE₂ und der gesteigerten Expression der Cox-2. Es zeigte sich, dass es nach Inkubation der LPS-stimulierten Zellen mit den beiden NO-Inhibitoren L-NMMA und Aminoguanidin (AG) zu einer Steigerung der Cox-Aktivität im Vergleich zu der nur mit LPS-stimulierten Vergleichsgruppe kam. Desweiteren konnten sie nachweisen, dass es bei der Inkubation von mit LPS und L-NMMA vorbehandelten Makrophagen mit den NO-Donatoren Sin-1, GSNO und SNP zu einer Hemmung der gesteigerten Cox-2-

Expression gekommen ist. Ebenso konnte von dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in dieses Geschehen nicht die Cox-1 involviert ist.

Auch Swierkosz et al. (122) zeigten diesen inhibitorischen Effekt von NO auf die Prostaglandinsynthese anhand einer Makrophagenzelllinie. Sie konnten mit Hilfe von ebenfalls mit LPS-stimulierten Makrophagen (J774,2) nachweisen, dass die PGI₂-Produktion (nachgewiesen durch Messung des stabilen Metaboliten 6-Keto-PGF_{1α}) von J774,2-Zellen durch die Inkubation mit dem NO-Donor SNP dosis- und zeitabhängig um 90 % gesenkt werden kann. Auch zeigte sich eine vierfach höhere 6-Keto-PGF_{1α}-Synthese nach 24-stündiger Inkubation mit L-NMMA. Ebenso konnte diese Arbeitsgruppe mit Hilfe von Western-Blot-Analysen zeigen, dass dieser Effekt Cox-2-abhängig ist.

Diese Ergebnisse konnten von Kosonen et al. (123) auch an humanen Endothelzellen von Nabelschnurvenen (HUVEC) gezeigt werden. Auch hier kam es nach Inkubation von LPS-stimulierten HUVEC mit den NO-Donatoren GEA 3175 und SNAP zu einer Hemmung der PGI₂-Freisetzung. Zugleich konnte mit Hilfe des selektiven Cox-2-Inhibitors NS-398 und mit Western-Blot-Analysen eine Cox-2-Abhängigkeit nachgewiesen werden.

Ebenso wiesen Amin et al. (124) auf einen negativen Zusammenhang zwischen NO und der PGE₂-Produktion hin. Sie benutzten in ihren Versuchen Knorpelzellen von an Osteoarthritis erkrankten Patienten und konnten auch hier zeigen, dass L-NMMA die PGE₂-Produktion in diesen Zellen steigern, NO-Donatoren die PGE₂-Freisetzung hingegen hemmen können. Auch hier konnte mittels Western-Blot eine Cox-2-Abhängigkeit nachgewiesen werden.

Stimulierung der Prostaglandin-Synthese und Cox-2-Expression durch NO

Es existieren jedoch auch eine Reihe Publikationen, die einen stimulierenden Einfluss von NO auf die Prostaglandin-Produktion aufzeigen.

Mei et al. (125) postulierten in ihrer Arbeit eine NO-abhängige PGE₂-Sekretionserhöhung in Epithelzellen des Kolons. An immortalisierten Kolonepithelzellen der Maus (YAMC) konnten sie zeigen, dass es in diesen mit IFN-γ und LPS stimulierten Zellen zu einer Hemmung der PGE₂-Synthese durch die NO-Inhibitoren L-NIL und SMT kommt. Ebenso konnten sie nachweisen, dass die Inkubation der YAMC's mit den NO-Donatoren NOR-1 und SNAP zu einer signifikant höheren Prostaglandin-Freisetzung führt. Mit Hilfe von

Western-Blot-Untersuchungen konnte darüber hinaus noch eine Cox-2-Abhängigkeit postuliert werden.

In der Lunge konnte dieser Einfluss von NO auf die Prostaglandin-Synthese von Watkins et al. (126) an der humanen Tumorzelllinie A549 mit Typ₂-Zell-Differenzierung gezeigt werden. Nach Stimulation der Zellen mit IFN γ , IL-1 β und LPS konnte eine signifikant höhere PGE₂-Freisetzung als in der Kontrolle detektiert werden, welche nach Zugabe des NO-Hemmers L-NAME wieder gesenkt werden konnte. Auch die exogene Zufuhr von NO zu den A549 Zellen durch den NO-Donator SNAP führte zu einem markanten Anstieg der Prostaglandin-Synthese.

Alle diese Arbeiten zeigen eine Aktivierung der Cyclooxygenase durch NO nach der Stimulation mit inflammatorischen Mediatoren wie LPS oder IFN- γ . Es konnte jedoch auch unter physiologischen Verhältnissen diese Beziehung nachgewiesen werden.

Davidge et al. (127) postulieren in ihrer Arbeit einen fördernden Effekt von NO auf die Prostaglandinsynthese in Endothelzellen. Sie nutzten jedoch, anders als die Arbeitsgruppe um Kosonen (123), keine HUVEC sondern mikrovaskuläre Endothelzellen der Koronararterien. Nach Stimulation der Endothelzellen mit dem Ca⁺⁺-Ionophore A23187 sezernierten diese signifikant mehr 6-Keto-PGF_{1 α} als die unstimulierte Kontrollgruppe. A23187 führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums. Es ist bekannt, dass die intrazelluläre Kalzium-Konzentrationserhöhung zu einer Aktivierung der cNOS und damit zu einer vermehrten NO-Freisetzung führt. Desweiteren konnten sie nach Zugaben der NO-Donatoren SNAP, NONOate und SNP eine markant höhere 6-Keto-PGF_{1 α} -Freisetzung feststellen. Auch konnte eine Hemmung der PGE₂-Freisetzung nach Stimulation mit A23187 mit dem NO-Inhibitor L-NAME gezeigt werden, dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Gabe des NO-Vorläufers L-Arginin wieder ausgeglichen werden

Auch Salvemini et al. (128) konnten dies an normalen, nicht entzündlich veränderten *ex vivo* perfundierten Kaninchennieren zeigen. So konnte sowohl eine erhöhte PGE₂-Freisetzung nach Infusion des NO-Donators SNP sowie der NO-Vorstufe L-Arginin gezeigt werden, als auch eine Hemmung der PGE₂-Synthese nach Infusion von L-MNNA.

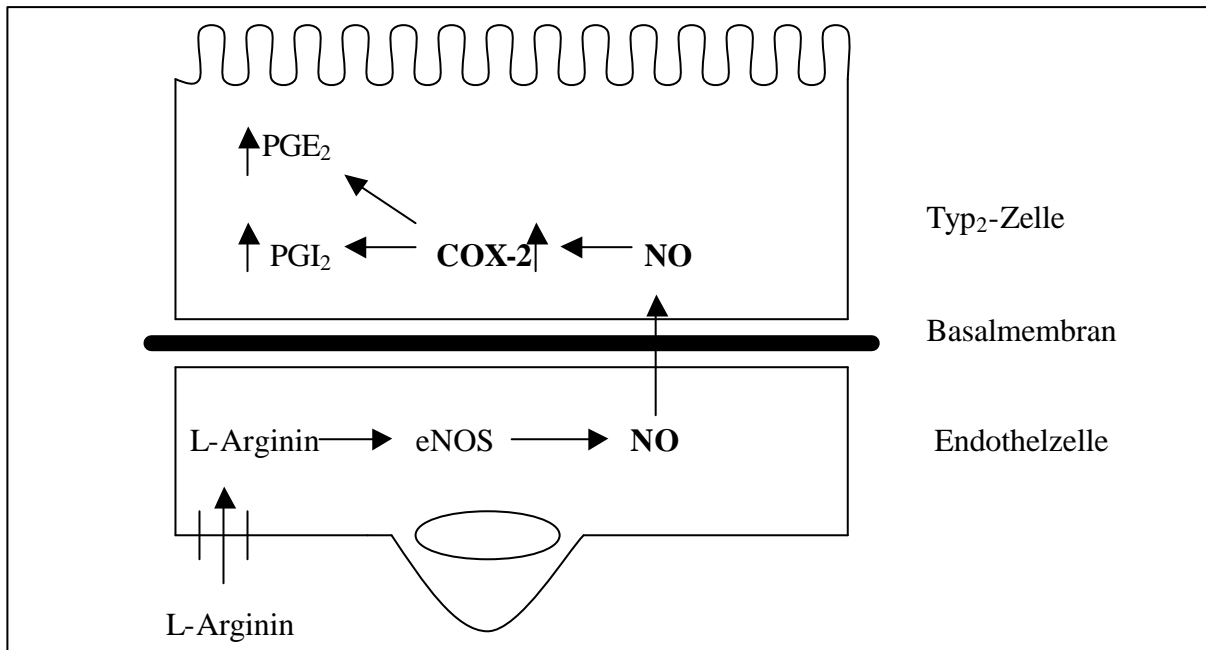
Eigene Ergebnisse zum Einfluss von NO auf die Prostaglandinsynthese

Die eigenen Untersuchungsergebnisse, welche einen stimulierenden Einfluss bei physiologischen Verhältnissen von NO auf die PGE₂- bzw. PGI₂-Freisetzung zeigen, sind mit diesen Erkenntnissen gut vereinbar.

Wie beschrieben, konnte die Freisetzung der beiden Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ in Typ₂-Zellen durch den NO-Donator SpermineNONOate und der Stickstoffmonoxid-Vorstufe L-Arginin dosisabhängig signifikant um das doppelte (PGE₂) bzw. 1,7-fache (PGI₂) im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden. Diese Werte erreichten das Niveau, welches auch hinsichtlich der PGE₂-und PGI₂-Freisetzung in dem Ko-Kultur-System aufgezeigt werden konnte.

Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass die gesteigerte Prostaglandin-Synthese im Ko-Kultur-Modell wahrscheinlich durch den Mediator NO vermittelt wird. In den Experimenten wurde die NO-Synthese in den Endothelzellen durch Vorinkubation mit dem NOS-Hemmer L-NMMA gehemmt und erst dann die Typ₂-Zellen hinzugegeben. Nach 48 Stunden Inkubation zeigte sich keine höhere Prostaglandin-Synthese im Vergleich zu den mono-kultivierten Typ₂-Zellen. Auch konnte, wie oben beschrieben, eine Cox-2-Abhängigkeit der erhöhten PGE₂- bzw. PGI₂-Freisetzung gezeigt werden. Nach Inkubation des Ko-Kultur-Modells mit dem spezifischen Cox-2-Hemmer NS-398 ließen sich nur noch minimale Mengen dieser Prostaglandine nachweisen. Dies macht deutlich, dass in Typ₂-Zellen sowohl die PGE₂-und PGI₂-Synthese in mono-kultivierten Zellen als auch die Steigerung der Freisetzung im Ko-Kultur-System Cox-2-abhängige Mechanismen darstellen.

Ebenso konnte geklärt werden, dass in Typ₂-Zellen auch unstimulierte Zellen Prostaglandine über die Cox-2 synthetisieren, sie also in diesen Zellen nicht nur im Rahmen der Inflammation hochreguliert werden kann. Die Cox-2 stellt demnach, anders als in anderen Zellen, in Typ₂-Zellen neben der Cox-1 auch eine konstitutive Form dar.

Abb.30: Postulierte Interaktionen zwischen Typ₂-Zellen und HLMEC

Postulierte Interaktionen im Ko-Kultur-Modell zwischen Typ₂-Zellen und mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen: L-Arginin wird als essentielle Aminosäure durch einen „kationischen Aminosäure-Transporter“ in die Endothelzellen aufgenommen. Dort wird es unter physiologischen Bedingungen durch die konstitutive endotheliale NO-Synthase in NO umgewandelt. NO diffundiert über die Basalmembran in die Typ₂-Zellen und führt dort zu einer Aktivitätserhöhung der Cox-2. Dies führt zu einer vermehrten Synthese und Freisetzung der Prostaglandine PGE₂ und PGI₂.

5.4 Mechanismen der erhöhten Prostaglandin-Synthese durch NO

Unklar ist hingegen noch, über welchen Mechanismus NO in Typ₂-Zellen die Cyclooxygenase-Aktivität erhöht.

Wie oben beschrieben, kann NO innerhalb der Zelle seine Wirkung cGMP-abhängig und cGMP-unabhängig induzieren. Bei der cGMP-unabhängigen Form kommt es zu einer direkten Interaktion von NO mit dem Zielenzym. Die cGMP-abhängigen Effekte werden indirekt über eine Proteinphosphorylierung ausgelöst.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass NO sowohl cGMP-abhängig wie –unabhängig zu einer erhöhten Prostaglandin-Synthese führen kann. Sautebin et al. (129), Davidge et al. (127) und Shinmura et al. (130) haben mit Hilfe von Guanylatzyklase-Inhibitoren gezeigt, dass die Prostaglandin-Freisetzung in den von ihnen untersuchten Zellen nach Einsatz dieser Substanzen durch NO nicht mehr stimuliert werden konnte. Auch in A549-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass es nach Inhibition der

Guanylatzyklase zu keiner Erhöhung der PGE₂-Synthese durch Stickstoffmonoxid mehr kommt (126).

Auf welche Weise NO bei der cGMP-unabhängigen Form die Aktivität der Cyclooxygenase erhöht war auch Gegenstand der Forschung. Auch hier wurden mehrere Möglichkeiten aufgezeigt. Neben der Bindung an die Guanylatzyklase sind weitere biologische Ziele von NO Eisen enthaltende Hämproteine (131). NO ist in der Lage über die Bindung an den Häm-Teil diese zu aktivieren. Ebenso wie cGMP stellt die Cyclooxygenase ein Häm-enthaltendes Protein dar. Es ist also möglich, das NO über diesen Mechanismus die Cox-Aktivität erhöhen kann. Desweiteren wirkt NO antioxidativ. Frei Radikale wie das O₂⁻ können abgefangen und zu weniger toxischen Metaboliten umgewandelt werden (132). Egan et al. (133) haben gezeigt, dass freie Radikale die Cyclooxygenase modulieren, NO als Radikalfänger demnach die Cox-Aktivität erhöhen könnte.

Mei et al. (125) postulierten einen weiteren möglichen Mechanismus, welcher zu einer PGE₂-Erhöhung führen könnte. Sie zeigten anhand von immortalisierten Kolonepithelzellen der Maus, dass NO dort zu einer Formation des β -Catenin/LEF-1-DNA-Komplexes führen kann. Diesem Komplex wiederum wird die Fähigkeit zugeschrieben, in Polypen und Adenomen des Kolons die Cox-2 hochzuregulieren.

Von Davidge et al. (127) wurde jedoch auch erwähnt, dass NO möglicherweise nicht „direkt“ an der Cyclooxygenase angreift, sondern zu einer Erhöhung der Aktivität der Phospholipase A₂ führt. Die dadurch vermehrt anfallende Arachidonsäure als Substrat der Cox-2 führt dann zu einer Aktivitätssteigerung dieses Enzyms.

Über welche dieser beschriebenen Mechanismen NO in Typ₂-Zellen zu einer Erhöhung der Cox-2-Aktivität führt oder ob in diesen Zellen möglicherweise vollkommen andere Signalwege ausschlaggebend sind, ist noch nicht geklärt und bedarf der weiteren Forschung.

5.5 Erniedrigte VEGF-Werte in der Ko-Kultur aus Typ₂-Zellen und HLMEC

VEGF ist ein potenter Wachstums- und Permeabilitätsfaktor für Endothelzellen. In den Typ₂-Zellen der Lunge wird es konstitutiv exprimiert und im Verlaufe von Erkrankungs- und Reperationsprozessen der Lunge im Alveolarepithel vermehrt synthetisiert. Auch in Folge eines ARDS konnten erhöhte VEGF-Werte festgestellt werden. Im Rahmen dieser

Arbeit sollen die Auswirkungen eines Ko-Kultur-Modells auf die VEGF-Freisetzung im Vergleich zu mono-kultivierten Typ₂-Zellen betrachtet werden.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass sich im Zellkulturüberstand der Ko-Kultur-Modelle aus Typ₂-Zellen und HLMEC 50 % weniger VEGF nachweisen ließen als in den Überständen der mono-kultivierten Typ₂-Zellen. Dies konnte sowohl für Typ₂-Zellen der Ratte als auch für humane Typ₂-Zellen dargestellt werden.

Zur Zeit sind nur wenige Publikationen erschienen, die sich mit einer verminderten VEGF-Freisetzung beschäftigen.

Ghiso et al. (134) haben gezeigt, dass NO eine hypoxie-induzierte erhöhte VEGF-Expression in immortalisierten humanen Retinaepithelzellen senken kann. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit dem NO-Donator SNP wurde eine signifikant niedrigere VEGF-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Betroffen war hierbei jedoch nicht die konstitutive Form der VEGF-Expression. In anderen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass auch nIFN- β (135) und Interferon- α (136) zu einer Suppression der VEGF-Synthese führen können.

Hinsichtlich der VEGF-Freisetzung konnte im Verlaufe dieser Arbeit keine Ursache für eine verminderte VEGF-Konzentration im Zellkulturmedium herausgearbeitet werden. Die Versuche haben gezeigt, dass weder NO noch die beiden Cyclooxygenasen Einfluss auf die gemessenen VEGF-Werte hatten.

Am wahrscheinlichsten ist in diesem Fall, dass das von den Typ₂-Zellen der Lunge freigesetzte VEGF von den HLMEC gebunden wird und damit nicht mehr im Medium nachweisbar ist. Nach Inkubation von HLMEC mit exogen zugeführtem VEGF ließ sich nach 24 Stunden Inkubation nur noch ein kleiner Teil der zuvor zugegebenen Menge VEGF nachweisen.

Zur genaueren Klärung müssen hier noch Versuche im Ko-Kultur-System mit Blockern der beiden VEGF-Rezeptoren Flt-1 und KDR angeschlossen werden. Welche Auswirkungen das gebundene VEGF im Ko-Kultur-Modell auf die Endothelzellen besitzt ist nicht Gegenstand dieser Arbeit und bedarf der weiteren Klärung.

5.6 Typ₂-Zellen entwickeln in der Ko-Kultur niedrigere elektrische Widerstände als mono-kultivierte Zellen

Die Typ₂-Zelle ist die Ursprungszelle des Alveolarepithels. Diese Zellen haben eine kuboidale Form und liegen in einzelnen Gruppen vor. Da bei den Typ₂-Zellen die Fähigkeit nur gering ist, interzelluläre Zellkontakte wie „tight-junctions“ auszubilden, sind diese nicht in der Lage, große elektrische Widerstände zu entwickeln. Bei Transdifferenzierung in eine Typ₁-Zellen steigt der Widerstand der Zellen an, da diese ausdifferenzierte Form die Fähigkeit zur Ausbildung von interzellulären Kontakten besitzt. Der Anstieg des epithelialen Widerstandes kann demnach als eine Typ₁-zellspezifische Größe gesehen werden und den Verlust der Typ₂-Zellcharakteristika anzeigen.

In der Arbeit von Hermanns et al. (107) konnte kein signifikanter Unterschied in den Widerständen von mono-kultivierten und ko-kultivierten Typ₂-Zellen gezeigt werden. Die mono-kultivierten A549-Zellen zeigten einen Anstieg des Widerstandes bis zu einem Maximalwert am 7. Tag auf $9\Omega\text{cm}^2$. Der Widerstand der im Ko-Kultur-System aus A549-Zellen und HLMEC gemessenen Werte lag mit einem Maximalwert von $9\pm 2,3\Omega\text{cm}^2$ nur leicht höher. Auch die Ko-Kultivation von NCL 441-Zellen, ebenso eine immortalisierte Alveolarepithelzelllinie, zeigte keinen markanten Unterschied in der Entwicklung der Widerstände.

Anders als bei diesen beiden Zelllinien entwickelte sich der Widerstand der in dieser Arbeit verwendeten primär isolierten Typ₂-Zellen. Der Widerstand der mono-kultivierten Typ₂-Zellen stieg vom 2.Tag bis zum 7.Tag auf einen Maximalwert von $1,4\text{k}\Omega$ an. Auch der Widerstand der ko-kultivierten Zellen stieg von $0,15\text{k}\Omega$ am 2.Tag bis auf $0,7\text{k}\Omega$ am 7.Tag an. Nach dem 7.Tag in Kultur ist in beiden Systemen der Widerstand langsam wieder gesunken. Der in dem Ko-Kultur-System gemessene Widerstand lag demnach um die Hälfte niedriger als der in den mono-kultivierten Alveolarepithelzellen.

Diese Erkenntnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass in dem Ko-Kultur-Modell die Transdifferenzierung von Typ₂-Zellen in Typ₁-Zellen später einsetzt und somit der Widerstand nicht die Werte der mono-kultivierten Alveolarepithelzellen erreicht.

Zur genaueren Untersuchung müssen hier jedoch noch weitere Versuche mit Typ₂-zellspezifischen Markern, wie beispielsweise Surfactantproteine und die Na^+/K^+ -ATPase, durchgeführt werden.

5.4 Therapeutische Relevanz der NO-Prostaglandin-Interaktionen

Die im Rahmen dieser Studie herausgearbeitete Erkenntnis, dass das aus mikrovaskulären Endothelzellen der pulmonalen Strombahn freigesetzte sowie auch exogen zugesetztes NO in Typ₂-Zellen zu einer erhöhten Produktion und Liberierung der beiden Prostaglandine PGE₂ und PGI₂ führt, kann physiologische, pathologische und therapeutische Relevanz besitzen.

Es konnte gezeigt werden, dass es nach Hemmung der endothelialen NOS zu keiner Steigerung der Prostaglandinsynthese aus Typ₂-Zellen in dem Ko-Kultur-Modell mehr kommt. Diese Beobachtung legt nahe, dass unter physiologischen Bedingungen die Aktivität der Cyclooxygenase permanent durch die endogene Produktion von NO aus Endothelzellen stimuliert wird. So kommt es nicht nur zu einem einfachen synergistischen Effekt von NO und PGI₂ auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und auf die Hemmung der Plättchenaggregation, sondern darüber hinaus zu einem potenzierenden Effekt durch die NO-induzierte PGI₂-Freisetzung aus Typ₂-Zellen. Weiterhin kann eine erniedrigte NO-Freisetzung aus Endothelzellen nicht nur zu einer verminderten Relaxation der Gefäßmuskulatur und der Plättchenaggregation führen, sondern dieser Effekt wird zudem noch durch die daraus folgende verminderte PGI₂-Freisetzung verstärkt.

In der Pathogenese des ARDS kommt es neben der exudativen Frühreaktion im Laufe der Erkrankung zu einer Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes sowie in der Spätphase zu einer zunehmenden Proliferation von Fibroblasten mit Fibrosierung.

Ein im Rahmen von klinischen Studien genutzter Ansatz zur Therapie des ARDS ist die inhalative Applikation von NO und PGI₂ (7,137). Die Inhalation dieser beiden Substanzen bei Patienten mit schwerwiegendem ARDS reduziert den pulmonal-arteriellen Druck und verbessert die arterielle Oxygenierung durch Verbesserung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses. Bisher ging man davon aus, dass dies einzig an der vasodilatatorischen Potenz dieser beiden einzelnen Substanzen liegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass NO nicht nur zu der bereits bekannten Relaxation der Gefäßmuskulatur führt, sondern dieser Effekt von NO noch durch dessen Stimulation der PGI₂-Freisetzung verstärkt wird. NO kann somit „direkt“ und „indirekt“ auf den Gefäßmuskeltonus wirken. Desweiteren hat diese Arbeit gezeigt, dass NO in Typ₂-Zellen die PGE₂-Synthese und -Freisetzung fördern kann. Auch dies dürfte auf weitere, im Rahmen der inhalativen NO-Therapie zu erwartende Auswirkungen hinweisen. Wie bereits erwähnt, kommt es im

Verlauf des ARDS sowohl zu einer verminderten Surfactantsynthese als auch in späteren Phasen der Erkrankung zu der Entwicklung einer Lungenfibrose. Viele Studien haben ergeben, dass PGE₂ in der Lage ist, die Surfactant-Synthese in Typ₂-Zellen zu erhöhen und die Fibroblasten-Proliferation zu hemmen. Durch den inhalativen Einsatz von NO in der Therapie des ARDS könnte folglich auch die Entwicklung einer Lungenfibrose und des Alveolenkollapses positiv beeinflusst werden.

Um diese Mechanismen jedoch weiter zu klären, sind noch weitere Experimente nötig, beispielsweise mit Ko-Kultur-Modellen aus Typ₂-Zellen und Fibroblasten.

6. Zusammenfassung

Das „Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS) ist ein häufig vorkommendes und schwer verlaufendes Krankheitsbild mit vielfältigen Ursachen. Hauptschädigungsort ist die sogenannte alveolo-kapilläre Membran der Lungen, bestehend aus den Alveolarepithelzellen Typ₁ und Typ₂ (Typ₁-Zellen und Typ₂-Zellen) sowie den mikrovaskulären Endothelzellen. Im Verlauf dieser Erkrankung kommt es zu einem Gefügeverlust des kapillären Endothels und des alveolären Epithels mit darauffolgendem interstitiellem wie alveolärem Lungenödem. Desweiteren hat es eine Infiltration mit Entzündungszellen und die Freisetzung verschiedenster Mediatoren zur Folge. Dies führt zu den typischen klinischen Merkmalen des ARDS mit Gasaustauschstörung und pulmonal-vaskulärer Widerstandserhöhung.

Viele Arbeiten sind bekannt, in welchen die Auswirkungen des ARDS auf die alveolo-kapilläre Membran an *in vivo*-Modellen, beispielsweise an isolierten Lungen- oder Ganztiermodellen, untersucht worden sind. Es existieren jedoch wenige Arbeiten bei denen ein *in vitro*-System zur Darstellung dieser Membran verwendet worden ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die alveolo-kapilläre Membran als *in vitro*-Modell aus Typ₂-Zellen sowie aus humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge (HLMEC) zu etablieren und auf die im Rahmen des ARDS vermehrt freigesetzten Parameter PGE₂, PGI₂ und VEGF im Vergleich zu den mono-kultivierten Typ₂-Zellen und HLMEC zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die Entwicklung des elektrischen Widerstandes, der als Marker für die Dedifferenzierung von Typ₂-Zellen in Typ₁-Zellen angesehen wird, in dem Ko-Kultur-Modell mit den mono-kultivierten Zellen verglichen werden.

Für das Ko-Kultur-Modell wurden zunächst die HLMEC auf die eine Seite einer Transwellmembran ausgesät, und, nach erfolgter Adhärenz dieser Zellen, auf der anderen Seite der Membran die Typ₂-Zellen aufgebracht. Zum Vergleich dienten Typ₂-Zellen und HLMEC, die jeweils alleine auf einem Transwell kultiviert wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es bei der Ko-Kultur aus Typ₂-Zellen und HLMEC zu einer gesteigerten PGE₂- und PGI₂-Synthese kommt. Innerhalb von 48 Stunden konnte dort das Doppelte der PGE₂- bzw. PGI₂-Werte im Vergleich zu den mono-kultivierten Kontrollen nachgewiesen werden. Dies konnte sowohl an einem rein humanen System aus Typ₂-Zellen und HLMEC als auch anhand eines Modells aus Typ₂-Zellen der Ratte und HLMEC gezeigt werden.

Hinsichtlich der erhöhten Freisetzung von PGE_2 und PGI_2 in der Ko-Kultur ergaben weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit, dass die gesteigerte Synthese Cox-2-abhängig ist. Auch konnte gezeigt werden, dass es für die gesteigerte Freisetzung des direkten Zellkontaktes bedarf, und dass sich die erhöhte Synthese dieser beiden Prostaglandine nicht mehr nachweisen lässt, wenn die beiden Zelltypen in einem gewissen Abstand voneinander kultiviert wurden.

Als möglicher Mediator, der diese gesteigerte Synthese vermittelt, wurde im Verlaufe dieser Arbeit Stickstoffmonoxid (NO) herausgearbeitet. Nach Hemmung der endothelialen NO-Synthase durch Präinkubation der HLMEC mit dem NO-Synthase-Hemmer L-NMMA ist es zu keiner Steigerung der PGE_2 - und PGI_2 -Freisetzung mehr gekommen. Die gemessenen Werte bewegten sich auf dem Niveau der mono-kultivierten Typ₂-Zellen. Desweiteren war es möglich, die Synthese dieser beiden Prostaglandine durch die Inkubation von mono-kultivierten Typ₂-Zellen mit dem NO-Donator Spermine NONOate sowie der NO-Vorstufe L-Arginin um bis zu 100 % zu steigern.

Bei der Messung der Werte für VEGF stellte sich heraus, dass sich im Ko-Kultur-System nur noch die Hälfte der VEGF-Konzentrationen im Vergleich zu den einzeln kultivierten Zellen nachweisen ließen. Weitere Untersuchungen ergaben hinsichtlich der gemessenen VEGF-Werte jedoch, dass das von den Typ₂-Zellen gebildete VEGF wahrscheinlich an den HLMEC gebunden wird und damit nicht mehr im Medium nachweisbar ist.

Bei der Messung des elektrischen Widerstandes zeigte sich, dass der Widerstand im Ko-Kultur-System im gesamten Messzeitraum um über 100 % niedriger war als bei den mono-kultivierten Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Ko-Kultur mit HLMEC der Dedifferenzierung der Typ₂- zu Typ₁-Zellen entgegenwirkt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die gesteigerte Synthese der beiden Prostaglandine PGE_2 und PGI_2 im Ko-Kultur-Modell durch den aus mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen freigesetzten Mediator NO bedingt ist. Stickstoffmonoxid gelangt hierbei zu den Typ₂-Zellen und führt dort zu einer Hochregulierung der Cox-2. Dies wiederum steigert die Produktion dieser beiden Prostaglandine.

Der Grund für die erniedrigten VEGF-Werte während der Ko-Kultur scheint durch eine Bindung von VEGF an die HLMEC bedingt zu sein, da es nach Inkubation nicht mehr im Kulturmedium nachweisbar ist.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die signifikant niedrigeren Widerstände in der entwickelten Ko-Kultur im Vergleich zu den mono-kultivierten Typ₂-Zellen können ein

Hinweis auf eine spätere Dedifferenzierung von Typ₂-Zellen in Typ₁-Zellen sein. Hierfür spricht, dass ein Anstieg des elektrischen Widerstandes als Marker für die Entwicklung zu Typ₁-Zellen gilt.

Summary

The “Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS) is a frequent and often fatal disease with a variety of causes. The main site of damage is the so-called alveolocapillary membrane of the lung, consisting of alveolar epithelial cells type₁ and type₂ (type₁ cells and type₂ cells) and microvascular endothelial cells. In the course of the disease there is a loss of intercellular adhesion of the capillary endothelium and the alveolar epithelium followed by interstitial and alveolar pulmonary edema. It also leads to infiltration by inflammatory cells and mediators.

The consequences are the typical clinical characteristics of ARDS with disturbed respiratory exchange and enhanced pulmonary-arterial resistance.

Many studies have dealt with the effects of ARDS on the alveolocapillary membrane in *in vivo* models, but there are only few studies have used an *in vitro* model to characterise this membrane.

The aim of this study was to establish an alveolocapillary membrane *in vitro* (consisting of type₂ cells and human lung microvascular endothelial cells (HLMEC)) and to analyse the factors PGE₂, PGI₂ and VEGF which are liberated in the course of ARDS in comparison to mono-cultivated type₂ cells and HLMEC.

A further aim was to compare the development of the electrical resistance, which is a marker of the dedifferentiation of type₂ cells to type₁ cells, between the co-culture model and the mono-cultivated cells.

For the co-culture model HLMEC were first placed on the lower surface of an inverted transwell membrane. After they reached adherence the type₂ cells were placed on the other side of the membrane. Mono-cultivated cells were used for comparison.

The results of this study revealed an increased synthesis of PGE₂ and PGI₂ in the co-culture model. Within 48 hours twice as much PGE₂ and PGI₂ was detected as in the mono-cultivated cells. This was shown in a pure human system consisting of type₂ cells and HLMEC as well as in a model consisting of rat type₂ cells and HLMEC.

The enhanced release of PGE₂ and PGI₂ in the established co-culture model proved to be cox-2 dependent. It was also shown that the cells require direct cell contact for the enhanced synthesis. No enhancement was detected when the cells were cultured at a distance from each other.

Nitric oxide (NO) was shown to be a possible mediator of this increased synthesis. After the inhibition of endothelial NO synthase by preincubating the HLMEC with the L-arginine antagonist L-NMMA no enhancement of the PGE₂ and PGI₂ synthesis was seen. Furthermore it was possible to increase the PGE₂ and PGI₂ production by up to 100% by incubating mono-cultivated type₂-cells with the NO donor SpermineNONOate and L-arginine.

During the measurements of VEGF it became apparent that only half of the VEGF concentration was detected in the co-culture model in comparison with the mono-cultivated cells. However, further investigations revealed that VEGF produced by type₂ cells is bound by the HLMEC and therefore could not be detected in the cell-culture supernatant.

Measurement of the electrical resistance showed that the resistance in the co-culture model was 100% lower than in the mono-cultivated type₂ cells. These results indicate that co-cultivation with HLMEC counteracts the dedifferentiation from type₂ to type₁ cells.

The results of this study showed that the enhanced synthesis of both prostaglandins PGE₂ and PGI₂ in the co-culture model is caused by NO released by microvascular pulmonary endothelial cells. Nitric oxide reaches the type₂ cells and results in an upregulation of cox-2. This enhances the production of both prostaglandins.

The reduced VEGF concentration during co-culture appears to be due to the effect of binding of this mediator by the HLMEC.

The significantly lower resistance in the co-culture model in comparison to the mono-cultivated type₂ cells could be seen as an indication of a later dedifferentiation from type₂ cells to type₁ cells, because augmentation of the electrical resistance is a marker of the differentiation to type₁ cells.

7. Literaturverzeichnis

1. Barchow D, Schirop TR. Klinik und Prognose des akuten Lungenversagens. *Atemw.-Lungenkrh.* 1987;13:527-533
2. National Heart and Lung Institut, National Institut of Health: 1972. Respiratory distress syndromes: Task force on problems, research approaches, needs. US Government Printing Office, Washington, DC. DHEW Publications No.(NIH). 1972;165-180
3. Villar J, Slutsky AS. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:814-816
4. Webster NR, Cohen AT, Numm JF. Adult respiratory distress syndrome- How many cases in the U.K.?. *Anaesthesia.* 1988;43:923-926
5. Elliot CG, Rasmusson BY, Crapo RO. Prediction of pulmonary function abnormalities after adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Am Rev Respir Dis.* 1987;135:634-638
6. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TC. Acute respiratory distress in adultes. *Lancet.* 1967;2:319-323
7. Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Therapie des ARDS. *Intensiv Med* 1999;36:104-125
8. Bennard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lanny M, Legall JR, Moris AQ, Spragg R and the Consensus Committee: The American-European Consensus conference on ARDS. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:818-824
9. Elsasser S, Perruchoud AP. Mediatoren und ARDS. *Schweiz med Wschr.* 1991;121:1530-1537
10. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* 2004;202:145-156
11. Imhof E, Perruchoud AP. Das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen. *Med Klein.* 1990;85:326-331
12. Schmidt R.F, Thews G. Physiologie des Menschen. 26. Auflage, 568-571, 1995.
13. Weibel, ER. Lung morphometry and models in respiratory physiology. In: *Respiratory Physiology. An Analytical Approach.* Edited by Chang HK and Paiva M. New York: Dekker, 1989, 1-51
14. Löffler G, Petriges P. Biochemie und Pathobiochemie. 6. Auflage, 910-911, 1998.

15. Macklin CC: The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes. *Lancet* 1954; 1099-1104
16. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:332-337
17. Haies DM, Gil J, Weibel ER. Morphometric study of rat lung cells. I. Numerical and dimensional characteristics of parenchymal cell population. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:533-541
18. Junqueira LC, Carneiro C. Histologie. Springer-Verlag, 3.Auflage, 409-414, 1996.
19. Shannon JM, Emrie JA, Fisher JH, Kuroki Y, Jennings SD, and Mason RJ. Effect of a reconstituted basement membrane on expression of surfactant apoproteins in cultured rat alveolar type II cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2: 183-192, 1990
20. Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G. Transformation of alveolar type II cells to type I cells following exposure to nitrogen dioxide. *Exp Mol Pathol* 1975;22:145-150
21. Fehrenbach H, Kasper M, Tscherning T, Pan T, Schuh D, Shannon JM, Müller M, Mason RJ. Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Respir J* 1999 ; 534-544
22. Risco C, Romero C, Bosch MA, Pinto dSP. Type II pneumocytes revisited: intracellular membranous system, surface characteristics, and lamellar body secretion. *Lab invest* 1994;70:407-417
23. Young SL, Fram EK, Craig BL. Three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of rat lung type II cells: a computer-based study. *Am J Anat* 1985;174:1-14
24. Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:75-81
25. Williams MC. Endocytosis in alveolar type II cells: Effect of charge and size of tracers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6054-6058
26. Dobbs LG, Mason RJ, Williams MC, Benson BJ, Sueishi K. Secretion of surfactant by primary cultures of alveolar type II cells isolated from rats. *Biochim Biophys Acta* 1982 Oct 14;713(1):118-127
27. Dobbs LG, Mason RJ. Stimulation of secretion of disaturated phosphatidylcholine from isolated alveolar type II cells by 12-o-tetradecanoyl-13-phorbao acetate. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:705-733

28. Post, M Batenburg JJ, Smith BT, van Golde LMG. Pool sizes of precursors for phosphatidylcholine formation in adult rat lung type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1984;795:552-557
29. Haagsman HP, van Golde LMG. Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu Rev Physiol* 1991;51:441-464
30. Van Golde LMG, Batenburg JJ, Robertson B. The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev* 1988;68:374-455
31. Kuroki Y, Voelker DR. Pulmonary surfactant proteins. *J Biol Chem* 1994;269:25943-25946
32. Creuwels LAJM, van Golde LMG, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system. Biochemical and clinical aspects. *Lung* 1997; 175:1-39
33. Johansson J, Curstedt T, Robertson B. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 1994;7:372-391
34. Chander A, Fisher AB. Regulation of lung surfactant secretion. *Am J Physiol* 1990; 258:L241-L253
35. Wright JR, Dobbs LG. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:395-414
36. Wright JR, Clemens JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:426-444
37. Rüstow B, Nakagawa Y, Rabe H, Waku K, Kunze D. Species pattern of phosphatidylinositol from lung surfactant and a comparison of species pattern of phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol synthesized de novo in lung microsomal fractions. *Biochem J* 1988;254:67-71
38. Ebert R. Small airways of the lung. *Annals of Internal Med* 1978;88:1-9
39. Jarstrand C. Role of surfactant in pulmonary defense system. In: Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ. Eds. *Pulmonary surfactant*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 1985:187-202
40. Strunk RC, Eidlen DM, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathway. *J Clin Invest* 1988;81:1419-1426
41. Stratton CJ. Morphology of surfactant producing cells and the alveolar lining. In: *Pulmonary Surfactant*. Robertson G, van Golden LMG, Batenburg JJ, editors. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1984:76-118

42. Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S, Pietschmann S. Host defense capacities of pulmonary surfactant: evidence for `non-surfactant` functions of the surfactant system. *Eur J Clin Invest* 1994 ;24 :586-599
43. Mastrangeli A, Danel C, Rosenfeld MA, Stradford-Perricaudet L, Perricaudet M, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. Diversity of airway epithelial cell targets for in vivo recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J Clin Invest* 1993;91:225-234
44. Irvani J, van Ass A. Mucustransport in the tracheobronchial tree of normal and bronchitic rats. *J Path* 1972;106:81-86
45. van Iwaarden JF, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golden LMG. Pulmonary surfactant protein A enhances the host defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;2:91-98
46. Weissbach S, Neuendank A, Petterson M, Schaberg T, Pison U. Surfactant protein A modulates the release of reactive oxygen species from alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1994;267:L660-L666
47. Wright JR, Youmans DC. Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *Am J Physiol* 1993;264:L338-344
48. Pikaar JC, Voorhout WF, van Golde LMG, Verhoef J, van Strijp JAG, van Iwaarden JF. Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of Gram-negative bacteria by alveolar macrophages. *J Infect Dis* 1995;172:481-489
49. van Iwaarden JF, van Strijp JAG, Ebskamp MJM, Welmers AC, Verhoef J, van Golde LMG. Surfactant Protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type I by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1991;261:L204-L209
50. Kuan S-F, Rust K, Crouch E. Interaction of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides: surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J Clin Invest* 1992;90:97-106
51. Krochmal EM, Ballard ST, Yankaskas JR, Boucher RC, Gatsy JT. Volume and ion transport by fetal rat alveolar and tracheal epithelial in submersion culture. *Am J Physiol* 1989;256:F397-407
52. Taylor AE, Guyton AC, Bishop VS. Permeability of the alveolar epithelium to solutes. *Circ Res* 1965;16:353-362
53. Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt JS, Berry LC. Transepithelial transport by pulmonary type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:6033-6037

54. Goodman BE, Crandall ED. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1982;243:C96-C100
55. Matthay MA, Landolt CC, Staub NC. Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1982;53:96-104
56. Russo MR, Lubman RL, Crandall ED. Evidence for amiloride-sensitive sodium channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1992;262:L405-411
57. Schneeberger EE, McCarthy KM. Cytochemical localisation of Na⁺-K⁺-ATPase in rat type II pneumocytes. *J Appl Physiol* 1986;60:1548-1589
58. Kallenberg CGM, Schilizzi BM, Beaumont F, Poppema L, de Leij L, The TH. Expression of class II MHC antigens on alveolar epithelium in fibrosing alveolitis. *Clin exp Immunol* 1987; 67:182-190
59. Simon RH, Paine III R. Participation of pulmonary alveolar epithelial cells in lung inflammation. *J Lab Clin Med* 1995;126:108-118
60. Strunk CR, Eidlen DM, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest* 1988;81:1419-1426
61. De Vries ME, Ran LO, Kelvin DJ. On the edge : The physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammation and immunological responses. *Semin Immunol* 1999;11:95-104
62. Simmons DL, Xie W, Chipman JG, Evett GE. Multiple cyclooxygenases: cloning of a mitogen-inducible form. In: *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins PAF*, edited by Bailey JM. New York: Plenum, 1991;67-78
63. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localisation of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998;273:9886-9893
64. Marnett LJ. Aspirin and potentiell role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 1992;52:5575-5589
65. Schafer AI. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharm* 1995;35:209-219
66. De Witt D, Smith WL. Yes, but do they still get headaches?. *Cell* 1995;83:345-351
67. Smith WL, Langenbach R. Why are there two cyclooxygenase isozymes?. *J Clin Invest* 2001;107:1491-1495
68. Langenbach R, Loftin CD, Lee CA, Tiano H. Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1237-1242

-
69. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis(part I). *J Natl Can Inst* 1998;90:1529-1536
 70. Smith LM. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *J of Physiol* 1992;263:F181-F192
 71. Breyer RM, Bagdassaria CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors : subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:661-690
 72. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikobi F. Prostanoid receptors:structures, properties and functions. *Physiol Rev* 1999;79:1193-1226
 73. Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandine E₂ and interleukin-1 β . *Endocrinology* 1999;140:2685-2695
 74. Wedmore CV, Williams TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 1981;289:646-650
 75. Ruzicka T, Printz MP. Arachidonic Acid metabolism in skin: a review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1984;100:121-160
 76. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phippes RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology* 2002;23:144-150
 77. Choudhry MA, Ahmed Z, Sayeed MM. PGE(2)-mediated inhibition of T-cell p59(fyn) is independent of cAMP. *Am J Physiol* 1999;277:C302-C309
 78. Cosme R, Lublin D, Takafuji V, Lynch K, Roche JK. Prostanoids in human colonic mucosa : effects of inflammation on PGE(2) receptor expression. *Hum Immunol* 2000;61:684-696
 79. Mastino A, Piacentini M, Grelli S, Favalli C, Antuori F, Tentori L, Oliverio S, Garaci E. Induction of apoptosis in thymocytes by prostaglandin E₂ *in vivo*. *Dev Immunol*. 1992;2:263-271
 80. Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualde N. Dendritic cells issued *in vitro* from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 2001;209:19-28
 81. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijder-vint FG, Kapsenberg MC. Dendritic cells, obtained from peripheral-blood precursors in the presence of PGE₂, promote TH₂ responses. *Adv Exp Med Biol* 1997;417:363-367
 82. Rigas B, Goldman IS, Levine L. Altered eicosanoids levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 1993;122:518-523

-
83. Sumitani K, Kamijo R, Toyoshima T, Nakanishi Y, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E_2 production. *J Oral Pathol Med* 2001;30:41-47
84. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705
85. Sheller JR, Mitchell DD, Meyrick B, Oates J, Breyer R. EP_2 receptor mediates bronchodilatation by PGE_2 in mice. *J Appl Physiol* 2000;88:2214-2218
86. Hartert TV, Dworski RT, Mellen BG, Oates JA, Murray JJ, Sheller JR. Prostaglandin E_2 decrease allergene-stimulated release of prostaglandin D_2 in airways of subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:637-640
87. Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA, Crimi N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE_2 . *Trends in Immunology*. 2004;25:40-46
88. Moore BB, Peters-Golden M, Christensen PJ, Lama V, Kuziel WA, Paine III R, Toews GB. Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE_2 . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284:L342-L349
89. Morsy MA, Isohama Y, Miyata T. Prostaglandin E_2 increases surfactant secretion via the EP_1 receptor in rat alveolar type II cells. *Eur J Pharmacol*. 2001 ;426 :21-24
90. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of Prostaglandin Endoperoxides, Thromboxane A_2 and Prostacyclin. *Pharmacol Rev*. 1979;30:293-323
91. Goetzl JE, An S, Smith LW. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J*. 1995;9:1051-1058
92. Narumiya S, FitzGerald AG. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest*. 2001;108:25-30
93. Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-ishi S, Narumya S. Altered pain and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*.1997;388:678-682
94. Brigham K, Begley C, Bernard G, Hutchison AA *et al*. Septicemia and lung injury. *Clin Lab Med* 1983;3:719-744
95. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985

96. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med.* 1999;77:527-543
97. Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, Millar AB. Vascular endothelial growth factor may contribute to increase vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1601-1605
98. Thickett DR, Armstrong L, Millar AB. A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1332-1337
99. Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganisation of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem.* 1998;273(24):15099-15103
100. Maniscalco WM, Watkins RH, Finkelstein JN, Campbell MH. Vascular endothelial growth factor mRNA increases in alveolar epithelial cells during recovery from oxygen injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;13(4):377-386
101. Aird CW. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med.* 2004;32(Suppl.):271-279
102. Cines DB, Pollak SE, Buck AC, *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91:3527-3561
103. Kirkpatrick JC, Bittinger F, Klein CL, Hauptmann S, Klosterhalfen B. The role of the microcirculation in multiple organ dysfunction syndrome (MODS): a review and perspective. *Virchows Arch.* 1996;427:461-476
104. Cheek JM, Kim K.-J., Crandall ED. Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am J Physiol.* 1989;256:C688-693
105. Madara JL, Dharmasathaphorn. Occluding junction structure-function relationship in a cultured epithelial monolayer. *J Cell Biol.* 1985;2124-2133
106. Coleman DL, Tuet IK, Widdecombe JH. Electrical properties of dog tracheal cells grown in monolayer culture. *Am J Physiol.* 1984;246:C355-359
107. Hermanns IM, Unger RE, Kehe K, Peters K, Kirkpatrick CJ. Lung epithelial cell lines in coculture with pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier *in vitro*. *Lab Invest.* 2004;84:736-752
108. Uchida K, Ballermann BJ. Sustained activation of PGE₂ synthesis in mesangial cells cocultured with glomerular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1992;163:C200-209
109. Lindberg-Yucel T, Brunius G, Wondimu B, Andruen I, Modeer T. Enhanced cyclooxygenase-2 mRNA expression in human gingival fibroblasts induced by cell contact with human lymphocytes. *Eur J Oral Sci.* 2001;109 :187-192
110. Asano K, Lilly CM, Drazen JM. Prostaglandin G/H synthase-2 is the constitutive and

- dominant isoform in cultured human lung epithelial cells. *Am J Physiol.* 1996;271:L126-131
111. Ermert L, Emert M, Althoff A, Merkle M, Grimminger F, Seeger W. Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286(3):1309-1314
112. Baber SR, Champion HC, Bivalacqua TJ, Hyman AL, Kadowitz PJ. Role of cyclooxygenase-2 in the generation of vasoactive prostanoids in the rat pulmonary and systemic vascular bed. *Circulation.* 2003;108:896-901
113. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;299:373-376
114. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium dependent regulation of resting levels of cyclic AMP and tension in pulmonary arteries and veins. In Vanhoutte PM, ed. Relaxing and contracting factors: *Biological and Clinical Research*. 1st ed. Clifton, NJ: *Humana press*. 1988;309-332
115. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 2004;84:731-765
116. Ishii K, Sheng H, Warner TD, Förstermann U, Murad F. A simple and sensitive bioassay method for detection of EDRF with RFL-6 rat lung fibroblasts. *Am J Physiol.* 1991;261:H598-603
117. Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator in inflammation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995;210:93-101
118. Guitierrez HH, Nieves B, Chulmley P, Rivera A, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide dependent lung injury: oxidative protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:43-52
119. Wink DA, Cook JA, Mitchel. The effect of various nitric oxide donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys.* 1996;331:241-248
120. Patel R, Attur MG, Dave M, Abramson SB, Amin AR. Regulation of cytosolic COX-2 and Prostaglandin E₂ production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J of Immunol.* 1999;162:4191-4197
121. Habib A, Bernard C, Lebret M, Creminon C, Esposito B, Tedgui A, Maclouf J. Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal Macrophages. *J of Immunol.* 1997;158:3845-3851

122. Swierkosz TA, Mitchell JA, Warner TD, Botting RM, Vane JR. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol.* 1995;114:1335-1342
123. Kosonen O, Kankaanranta H, Malo-Ranta U, Ristimäki A, Moilanen E. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of prostacyclin production in human endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1998;125:247-254
124. Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, Stuchin SA, Patel IR, Abramson SB. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. *J Clin Invest.* 1997;99:1231-1237
125. Mei JM, Hord NG, Winterstein DF, Donald SP, Phang JM. Expression of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induced by nitric oxide in conditionally immortalized murine colonic epithelial cells. *FASEB.* 2000;14:1188-1201
126. Watkins DN, Garlepp MJ, Thompson PJ. Regulation of the inducible cyclo-oxygenase pathway in human cultured airway epithelial (A549) cells by nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1997 ;121 :1482-1488
127. Davidge ST, Baker PN, McLaughlin MK, Roberts JM. Nitric oxide by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ Res.* 1995 ;77 :274-283
128. Salvemini D, Seibert K, Masferrer JL, Misko TP, Currie MG, Needleman P. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *J Clin Invest.* 1994;93:1940-1947
129. Sautebin L, Ialenti A, Ianaro A, Di Rosa M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *Br J Pharmacol.* 1995;114:323-328
130. Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, Kodani E, Han H, Zhu Y, Bolli R. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res.* 2002;90:602-608
131. Goodwin DC, Landino LM, Marnett LJ. Effects of nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB.* 1999; 13:1121-1136
132. Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys.* 1991;289:130-136
133. Egan RW, Paxton J, Kuehl FA Jr. Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J Biol Chem.* 1976;251:7329-7335
134. Ghiso N, Rohan RM, Amano S, Garland R, Adamis AP. Suppression of hypoxia-

- associated vascular endothelial growth factor gene expression by nitric oxide via cGMP. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 ;40 :1033-1039
135. Bolling B, Fandrey J, Frosch PJ, Acker H. VEGF production, cell proliferation and apoptosis of human IGR 1 melanoma cells under nIFN-alpha/beta and rIFN-gamma treatment. *Exp. Dermatol.* 2000;9:327-335
136. Salven P, Anttonen K, Repo H, Joensuu H, Orpana A. Endotoxins induce and interferon- α suppresses vascular endothelial growth factor (VEGF) production in human peripheral blood mononuclear cells. *FASEB.* 2001;15:1318-1320
137. Walmrath D, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W. NO und alternative Therapieansätze bei pulmonaler Hypertonie. *Internist.* 1997;38:453-460
138. Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med.* 2004;141:460-470
139. Charbeneau RP, Christensen PJ, Paine III R, Toews GB, Peters-Golden M, Moore BB. Impaired synthesis of prostaglandin E₂ by lung fibroblasts and alveolar epithelial cells from GM-CSF^{-/-} mice: implications for fibroproliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284:1103-1111
140. Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1). *N Engl J Med.* 1992;327:28-37
141. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998;38:97-120
142. Hinz B, Brune K, Pahl A. Prostaglandin E(2) upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272(3):744-748
143. Gueven N, Glatthaar B, Manke HG, Haemmerle H. Co-cultivation of rat pneumocytes and bovine endothelial cells on a liquid-air interface. *Eur Respir J.* 1996;9:968-975
144. Kuebler WM, Parthasarathi K, Wang PM, Bhattacharya J. A novel signaling mechanism between gas and blood compartments of the lung. *J Clin Invest.* 2000; 105:905-913

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Grimminger, dem Direktor der Medizinischen Klinik V des Universitätsklinikums Giessen, danke ich für die Bereitstellung technischer und materieller Voraussetzungen zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Frank Rose möchte ich herzlich für die kompetente, umfangreiche Betreuung sowie für die Überlassung des interessanten Themas danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Robert Voswinckel dafür, dass er mir isolierte pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen in ausreichender Menge bereitgestellt hat.

Frau Gabriele Dahlem, Frau Anette Tschuschner und Herrn Andreas Jahn bin ich dankbar für die stete Unterstützung während meiner gesamten Zeit im Labor sowie für ihre Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern Dr. Peter Vokuhl und Dr. Angelika Rübesamen-Vokuhl sowie Gabriele Dahlem danke ich für die Korrektur des Manuskripts.

Das letzte und dennoch wichtigste Dankeschön an Eva für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Hilfe.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian Oliver Vokuhl
geboren am 14.06.1977
in Göttingen

Schulbildung

1983-1987	Urbanus-Grundschule Gelsenkirchen-Buer
1987-1996	Leibniz-Gymnasium Gelsenkirchen-Buer
06/1996	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1996-1997	Ableistung des Zivildienstes bei der AWO-Gelsenkirchen
-----------	--

Studium

1997-2003	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
2003-2004	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
01.09.1999	Ärztliche Vorprüfung
29.08.2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.04.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.05.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

2000-2004	Experimentelle Tätigkeit am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und Ausarbeitung der Dissertation
-----------	---

Berufliche Tätigkeit

seit 01/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel
--------------	---